

Einfluss von Lipidnanopartikeln auf humane Epithelzellen in Mikrosystemen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sascha Pretor
aus Holzminden

1. Referentin:

Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

2. Referent:

Prof. Dr. Andreas Dietzel

eingereicht am:

02.08.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am:

22.12.2017

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Pretor, S.; Bartels, J.; Lorenz, T.; Dahl, K.; Finke, J. H.; Peterat, G.; Krull, R.; Al Halhouli, A. T.; Dietzel, A.; Büttgenbach, S.; Behrends, S.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2015) Cellular uptake of coumarin-6 under microfluidic conditions into HCE-T cells from nanoscale formulations, Mol. Pharmaceutics 12 (1), S. 34-45

Tagungsbeiträge

Pretor, S.; Finke, J. H.; Al Halhouli, A. T.; Schmolke, H.; Busker, M.; Dietzel, A.; Büttgenbach, S.; Klages, C. P.; Behrends, S.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2012)

Development of a microfluidic system for screening of colloidal drug formulations under flow conditions

Poster, DPhG Jahrestagung Greifswald

Pretor, S.; Bartels, J.; Finke, Behrends, S.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2013)

Do phospholipid-stabilized nanoparticles enter mammalian cells?

Poster, Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg

Pretor, S.; Bartels, J.; Lorenz, T.; Dietzel, A.; Behrends, S.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2014)

Drug delivery from colloidal systems under flow conditions

Poster, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lissabon

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

darf ich hiermit meinen herzlichen Dank für die Zuweisung des Themas, die freundliche Betreuung und die ständige Bereitschaft zur umfassenden Diskussion aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Dietzel vom Institut für Mikrotechnik danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Seinen Mitarbeitern Dr.-Ing. Ala'aldeen Al-Halhouli und Dipl.-Ing. Thomas Lorenz danke ich für die Anfertigung der Mikrosysteme und ihre stete Bereitschaft zur Diskussion aus ingenieurwissenschaftlicher Sicht

Herrn PD Dr. Stephan Reichl danke ich für seinen fachlichen Rat zu Fragen der Kultivierungspraxis humaner Epithelzellen

Herrn Prof. Dr. Sönke Behrends und seinen Mitarbeiterinnen Mareike Busker, Joana Bartels und Julia Hochheiser danke ich für die zur Verfügung gestellten Materialien und die Unterstützung bei der Durchführung der Flussexperimente auf dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop.

Dr. Jörn Krauß vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig danke ich für seine Unterstützung bei der Markierung fester Lipidnanopartikel mittels kovalenter Farbstoffkopplung

Allen Kolleginnen und Kollegen des MikroPART-Projektes danke ich für die schöne Zeit in der Forschergruppe, die auf den fruchtbaren Tagungen und gemeinsamen Ausflügen leider viel zu schnell verging.

Des Weiteren danke ich allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmazeutische Technologie für die kollegiale Zusammenarbeit in stets angenehmster Atmosphäre. Insbesondere danke ich Friederike Kolditz herzlich für die Einweisung und Einarbeitung in die Kultivierung humaner Epithelzellen. Katharina Dahl danke ich für die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von SLN und Liposomen sowie Dr. Jan-Henrik Finke für die Einarbeitung in die Herstellung und Beladung fester Lipidnanopartikel mittels Mikrokanalanlage, seinen fachlichen Rat und seine stete Bereitschaft zur Diskussion. Hierfür, und auch für die schöne Zeit nach Feierabend danke ich meinen Freunden und Kollegen Christian Kölln und Daniel Saaber.

Schlussendlich danke ich meiner Familie für die Geduld und das Verständnis, mit der sie mich bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet hat.

Abkürzungsverzeichnis

A549	Humane Alveolarepithelzelllinie
a.u.	Arbitrary units
C6	Coumarin 6
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
DHPE	Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylethanolamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
η	Dynamische Viskosität
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HaCaT	<u>H</u> uman <u>a</u> ddult keratinocytes propagated under low <u>C</u> alcium conditions and elevated <u>T</u> emperature
HCE-T	Humane Cornea Epithelzellen
HDF	Humane dermale Fibroblasten
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LCI	Live Cell Imaging
LIP	Liposomen
μ BR	Mikrobioreaktor
MHEC5-T	Mäuseherzendothelzelllinie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Propidiumiodid
RFI	Relative Fluoreszenzänderung
SLN	Feste Lipidnanopartikel
τ	Scherstress, Schubspannung
z-average (PCS)	Intensitätsgewichteter, mittlerer Teilchendurchmesser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Mikrofluidik	3
2.1.1	Mikrofluidische Systeme	5
2.1.2	Komponenten	5
2.1.3	Materialien und Herstellungstechniken	8
2.1.4	Beispiele für Anwendungsgebiete mikrofluidischer Systeme	11
2.2	Mikrofluidische Systeme zur Kultivierung von Zellen.....	13
2.2.1	Mikrobioreaktoren	13
2.2.2	Bioreaktoren und mikrofluidische Systeme zur Kultivierung von Säugerzellen...	17
2.3	Feste Lipidnanopartikel	22
2.3.1	Definition	22
2.3.2	Herstellungstechniken	22
2.3.3	Interaktion mit Zellen	24
2.4	Liposomen.....	25
2.5	Nanoemulsionen	26
2.6	Modellarzneistoffe für nanoskalige Arzneistoffträger	27
2.7	Verfahren zur Untersuchung der Interaktion nanoskaliger Arzneistoffträger mit Säugerzellen unter Flussbedingungen	29
2.7.1	Zell-Partikel-Interaktion unter Flussbedingungen	29
2.7.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	30
2.7.3	Mikrosysteme zur Untersuchung der okulären Arzneistoffaufnahme in vitro	32
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Material	33
3.1.1	Rezepturgrundstoffe.....	33
3.1.2	Mikrobioreaktoren und Mikroflusskanäle	34
3.1.3	Gleichungen zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse	35
3.1.4	Verwendete Zelllinien.....	36
3.1.5	Allgemeine Kultivierungsbedingungen der Zelllinien.....	38
3.1.6	Zusammensetzung von Krebs-Ringer-Puffer (KRB).....	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Herstellung kolloidaler Arzneistoffträger und Phasentrennung.....	40

3.2.2	Charakterisierung kolloidaler Arzneistoffträger und Mikrokristalle	43
3.2.3	Oberflächenmodifizierung fester Lipidnanopartikel.....	44
3.2.4	Osmolaritätsbestimmung	45
3.2.5	Zellkultivierung in Mikroflusskanälen	45
3.2.6	Viabilitätsfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie	48
3.2.7	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	49
3.2.8	Fluorimetrie.....	54
3.2.9	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von SLN durch Epithelzellen	55
3.2.10	Toxizitätstests	55
3.2.11	Statistik	57
4	Ergebnisse und Diskussion	58
4.1	Charakterisierung der eingesetzten Formulierungen	58
4.1.1	Partikelgrößenanalyse und Zeta-Potential-Messung.....	58
4.1.2	Transmissionselektronenmikroskopie und Mikrokristallcharakterisierung.....	63
4.1.3	Osmolaritätsbestimmungen.....	66
4.1.4	Stabilität der Formulierungen in physiologischen Lösungen	66
4.1.5	Beeinflussung der Partikeleigenschaften durch Polyelektrolyte.....	69
4.1.6	Einbringen und Nachweis funktioneller Gruppen in SLN.....	71
4.2	Zusammenfassende Diskussion Partikelherstellung und -Charakterisierung	72
4.3	Toxizität von Lipidnanopartikeln auf die verwendeten Zelllinien.....	76
4.3.1	Resazurin-Assay	76
4.3.2	Zellviabilitätsfärbung	79
4.4	Zusammenfassende Diskussion Toxizität von Lipidnanopartikeln auf die verwendeten Zelllinien	80
4.5	Aufnahme von Coumarin 6 durch humane Epithel- und murine Endothelzellen unter statischen und unter Flussbedingungen.....	82
4.6	Zusammenfassende Diskussion zur Aufnahme von Lipidnanopartikeln und Coumarin 6 durch humane Epithel- und murine Endothelzellen unter Ruhe- und unter Flussbedingungen.....	87
4.7	Live Cell Imaging und Fluorimetrie unter statischen Bedingungen	90
4.7.1	Live Cell Imaging	90
4.7.2	Fluorimetrie.....	92

4.8	Zusammenfassende Diskussion Live Cell Imaging und Fluorimetrie unter statischen Bedingungen	96
4.9	Live Cell Imaging unter Flussbedingungen	99
4.9.1	Charakterisierung der Strömungsverhältnisse	99
4.9.2	Modellarzneistoffübertragung durch verschiedene Formulierungen	101
4.9.3	Kinetische Aspekte der Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen SLN und Liposomen	105
4.9.4	Einfluss der Flussexperimente auf die Viabilität von HCE-T Zellen	108
4.10	Zusammenfassende Diskussion Live Cell Imaging unter Flussbedingungen und Anwendbarkeit des verwendeten Mikrosystems	109
4.11	Live Cell Imaging unter Flussbedingungen bei gleichzeitiger und alternierender Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6 und Rhodamin B	113
5	Zusammenfassung	121
6	Conclusion	123
7	Literaturverzeichnis	124
8	Anhang Abbildungen	140
8.1	TEM-Aufnahmen	140
8.2	SLN-Toxizität auf HCE-T	141
8.3	A549, CaLu-3 und MHEC5-T mit SLN-C und SLN-DHPE	143
8.4	A549, CaLu-3 und HCE-T mit SLN DiI, SLN DiI PAH, SLN DiI PDADMAC und SLN DiI Poly-D-Lysin	148
8.5	Aufnahme von Coumarin 6 und SLN durch HCE-T Zellen unter Ruhebedingungen	153

1 Einleitung und Problemstellung

Kolloidale Arzneistoffträgersysteme sind Gegenstand intensiver Forschung und Entwicklung um schwer wasserlösliche Arzneistoffe bioverfügbar zu machen. Besonderes Interesse gilt festen Lipidnanopartikeln, wobei sich die Kombination von Hartfett und Lecithin als Grundlage für die Herstellung reproduzierbar kleiner und stabiler fester Lipidnanopartikel bewährt hat (Schubert und Müller-Goymann 2005). Hiervon wurden Formulierungen abgeleitet, in die Arzneistoffe wie Estradiol und Hydrocortison eingearbeitet wurden (Friedrich et al. 2005). In einer weiteren Arbeit wurde nach Einarbeitung von Diclofenac in oberflächenmodifizierten festen Lipidnanopartikeln dessen retardierte Freisetzung und anschließende Permeation durch humane Corneakonstrukte nachgewiesen (Attama et al. 2009).

Neuartige Wirkstoffe sind oft schwer wasserlöslich und stehen am Beginn einer Formulierungsentwicklung häufig nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung. Um erforderliche Formulierungsscreenings durchführen zu können, erfolgte im Rahmen der Forschergruppe mikroPART die Entwicklung eines Mikrosystems zur Herstellung von Dispersionen fester Lipidnanopartikel mittels Hochdruckschmelzhomogenisation mit Volumina von jeweils nur 15 mL unter Variation verschiedener Prozessparameter (Finke et al. 2012). Parallel wurden in der Forschergruppe Mikrobioreaktoren zum Screening von Prozessparametern für die biotechnologische Gewinnung von Wirksubstanzen aus Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) entwickelt und charakterisiert. So wurde ein vertikales, mit Mikroluftblasen begastes Mikrobioreaktorsystem konstruiert und in Betrieb genommen (Demming et al. 2012; Peterat et al. 2014). Für die *in-vitro*-Kultivierung humaner Zelllinien, an denen die Toxizität neu entwickelter Arzneistoffformulierungen getestet wird, werden hingegen Mikrotiterplatten verwendet. Hiermit konnte beispielsweise gezeigt werden, dass feste Lipidnanopartikel aus hydriertem Palmöl und Lecithin *in-vitro* keine immunologisch getriggerte Reizwirkung in humanen Alveolarepithelzellen auslösen (Nassimi et al. 2010b). In der gleichen Arbeit wurde damit begonnen, die zelluläre Aufnahme der Lipidnanopartikel unter Ruhebedingungen zu untersuchen. Bei der Untersuchung der Interaktion von kolloidalen Arzneistoffträgern mit humanen Epithelzellen können Mikrotiterplatten jedoch nicht den Fluss von Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe, Tränen und anderen Sekreten nachstellen. Alternativ bieten Mikrofluidiksysteme wie beispielsweise Mikrobioreaktoren durch Kombination von kleinen Probenvolumina und kontinuierlichem Mediumfluss die

Möglichkeit einer Annäherung an physiologische Bedingungen. Dies erscheint geboten, da u.a. gezeigt wurde, dass humane venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) *in-vitro* weniger zur Apoptose neigten, wenn sie statt unter Ruhebedingungen mit einem Scherstress von 15 dyn/cm^2 kultiviert wurden (Dimmeler et al. 1998). Aktuelle Untersuchungen ergaben, dass Beanspruchungen dieser Art auch die zelluläre Aufnahme von kolloidalen Arzneistoffträgern beeinflussen, wie u.a. mit fluoreszenzmarkierten Silikatnanopartikeln gezeigt wurde, welche von HUVEC *in-vitro* bevorzugt unter einer Scherbeanspruchung von $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ aufgenommen wurden (Prina-Mello et al. 2012). Die Untersuchung der Partikellokalisierung erfolgte hierbei mittels leistungsfähiger mikroskopischer Methoden wie der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).

Im Vergleich zur systemischen Arzneistoffaufnahme über das Blutgefäßsystem wurden die Auswirkungen von lidschlagbedingtem Scherstress und von Tränenfluss auf die Arzneistoffaufnahme am Auge bisher kaum untersucht. Doch gerade am Auge sind die Wirkstoffverluste nach der Applikation mit 70-90 % besonders hoch, sodass die durch die Arzneiform zum Wirkort gebrachte Arzneistoffmenge schwer kalkulierbar ist. Um den Einfluss von Lidschlag und Tränenfluss näher zu beleuchten, sollten in der vorliegenden Arbeit aus Mikrobioreaktoren weiterentwickelte mikrofluidische Systeme verwendet werden, damit die Arzneistofflieferung an humane Corneaepithelzellen (HCE-T) mittels kolloidaler Arzneistoffträger ressourcenschonend mit Hilfe des Modellarzneistoffes Coumarin 6 untersucht werden kann. Die Ziele der folgenden Arbeit waren demnach:

- die Kultivierung humaner Epithel- bzw. muriner Endothelzelllinien von Corneaepithel, Alveolarepithel und Herzendothel in mikrofluidischen Systemen auf Basis einer Weiterentwicklung von Mikrobioreaktoren
- die Evaluierung der Interaktion fester Lipidnanopartikel mit den Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und CLSM
- die vergleichende Quantifizierung der Coumarin 6-Aufnahme in humane Corneaepithelzellen aus verschiedenen nanoskaligen Arzneistoffträgern in Echtzeit unter Ruhebedingungen und unter dem Einfluss definierter Scherbedingungen in Mikroflussskanälen
- eine gezielte Modifizierung von Lipidnanopartikeln durch Fluoreszenzmarkierung der Lipidmatrix und Änderung der Oberflächeneigenschaften der Partikel mittels Adsorption von Polyelektrolyten zur Evaluation von deren Einfluss auf den Partikelverbleib in und an humanen Corneaepithelzellen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik beschäftigt sich mit der Konstruktion, Herstellung und Charakterisierung von Strukturen mit Abmessungen im Mikrometerbereich, in denen sich Flüssigkeitsströme mit einem Volumen von wenigen Mikro- oder Nanolitern gezielt bewegen sollen (Nguyen 2004). Durch das große Oberfläche/Volumen-Verhältnis in mikrofluidischen Systemen überwiegen die Haftkräfte der Flüssigkeit deren Trägheitskräfte. Das bedeutet, dass im Vergleich zu Bulksystemen, wie z.B. einem Becherglas mit Magnetrührkern, wesentlich stärkere Interaktionen zwischen der Flüssigkeit und dem Material des Flusssystems stattfinden (Beebe et al. 2002). So füllt sich z.B. eine dünne Glaskapillare von selbst mit Wasser. Triebkraft hierfür ist die Oberflächenspannung des Wassers, wodurch die Grenzfläche zur umgebenden Luft möglichst klein gehalten werden soll. Das Wasser benetzt aus diesem Grund bevorzugt die innere Wand der Glaskapillare und steigt darin auf (sog. Kapillarkraft), bis ein Gleichgewicht zwischen hydrostatischem Druck und Kapillarkraft erreicht ist.

Der wichtigste Unterschied zu Bulksystemen ist das Vorherrschen laminarer Strömungen (angedeutet in Abb. 2-1A), welche durch Reynolds-Zahlen weit unter 2300 charakterisiert sind, sodass sich in der Mikrofluidik wegen der fehlenden Konvektion zwei Flüssigkeitsströme ausschließlich mittels Diffusion mischen können (Abb. 2-1B). Dieser Prozess läuft durch die geringeren Abmessungen in Mikrosystemen jedoch deutlich schneller ab als in Bulksystemen. Ähnlich wie bei der Chiptechnologie in der Elektronik, bei der elektrische Ladungen möglichst viele Informationen binnen kürzester Zeit auf kleinstem Raum verarbeiten sollen, sind die wesentlichen Ziele beim Einsatz mikrofluidischer Systeme neben der Minderung des Platz- und Reagenzienverbrauches die Parallelisierung von chemischen Reaktionen (Dittrich und Manz 2006) und die Nachbildung physiologischer Flussprofile (Esch et al. 2011). Ein solches Flussprofil ist parabolisch, d.h. durch die Wandreibungskräfte steigt die Fließgeschwindigkeit des Mediums in Richtung Kanalmitte an (Abb. 2-1A). Die Wandreibungskräfte der bewegten Flüssigkeit äußern sich in einem Scherstress τ , der direkt proportional zur Flussrate Q [m^3s^{-1}] und zur dynamischen Mediumviskosität μ [$\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$] bzw. umgekehrt proportional zu Höhe h und Breite w des Kanals ist (Gl. 2-1, Kim et al. 2011).

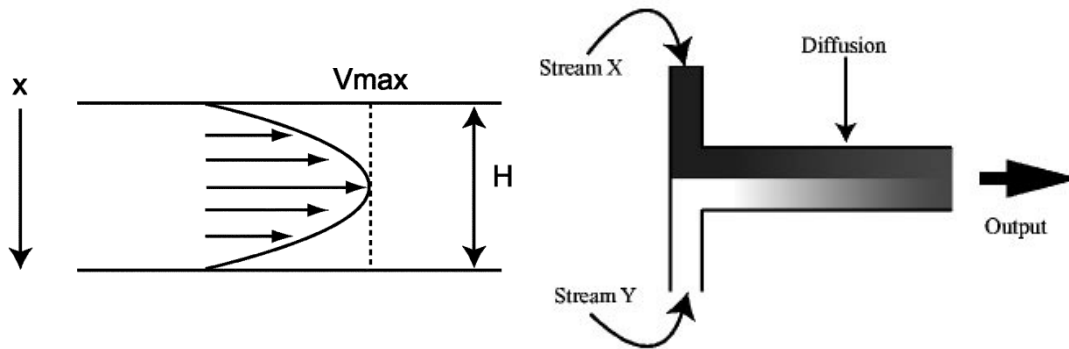


Abb. 2-1: (A) Strömungsprofil in einem mikrofluidischen System. Es liegt eine laminare Strömung vor, die maximale Strömungsgeschwindigkeit wird wegen der Wandreibung auf halber Kanalhöhe $H/2$ erreicht (Walker et al. 2004). (B) Mischungsverhalten zweier verschiedener Flüssigkeiten auf mikrofluidischer Ebene. Beide Ströme fließen parallel zueinander, die Durchmischung erfolgt ausschließlich mittels Diffusion (Beebe et al. 2002).

Bedingung für die Gültigkeit von Gl. 2-1 ist, dass die Kanalbreite die Kanalhöhe stark übersteigt ($w \gg h$), was in der Mikrofluidik der Fall ist. Der Scherstress wird in der Einheit Pascal [Pa] oder bei älteren Veröffentlichungen bzw. im medizinischen Bereich mit Dyn pro Quadratzentimeter [dyn/cm^2] angegeben. Ein Pascal entspricht dabei zehn Dyn pro Quadratzentimeter.

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2} \quad \text{Gl. 2-1}$$

Flüssigkeiten wie Wasser werden als newtonsch bezeichnet, da hier der Scherstress direkt proportional zur Scherrate γ [s^{-1}], welche dem Verformungsgrad des Flüssigkeitskörpers entspricht, ist. Die dynamische Mediumviskosität, in diesem Zusammenhang mit η bezeichnet, stellt die Proportionalitätskonstante dar (Gl. 2-2). Die Scherrate, welche in Abb. 2-1a als Vektorpfeil gezeigt ist, ist umso größer, je größer der Längenunterschied der einzelnen Vektorpfeile zueinander ist.

$$\tau = \eta \cdot \gamma \quad \text{Gl. 2-2}$$

In einigen Veröffentlichungen über Scherstress in mikrofluidischen Systemen wird statt des Scherstress nur die Scherrate angegeben, wobei der auf Kanalwänden oder kultivierten Zellen lastende Scherstress aus der Scherrate nur bei bekannter dynamischer Mediumviskosität berechnet werden kann.

2.1.1 Mikrofluidische Systeme

Im Folgenden wird zunächst der grundlegende Aufbau von mikrofluidischen Systemen anhand ihrer Komponenten dargestellt. Anschließend erfolgt die Beschreibung einzelner Anwendungsgebiete mit dem Fokus auf der Kultivierung einzelliger Mikroorganismen und Säugetierzellen in mikrofluidischen Systemen.

2.1.2 Komponenten

Je nach Anwendungsgebiet bestehen mikrofluidische Systeme aus verschiedenen Komponenten, die die verwendeten Flüssigkeiten oder Gase bewegen und deren einzelne Bestandteile mischen, trennen und detektieren. Die verschiedenen Komponenten sind dabei vorzugsweise im Mikrosystem integriert, häufig aber auch außerhalb des Mikrosystems befindlich. Ein einfaches mikrofluidisches System besteht aus einem Medium- bzw. Reagenzienreservoir, einem Kanalsystem und einer Pumpe zur Bewegung der Flüssigkeit. Ein greifbares Beispiel hierfür stellt eine labortechnische Anlage zur Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) dar, die über ein Fließmittelreservoir, leistungsfähige Pumpen zur Erzeugung von Drücken >10 bar und eine nachgeschaltete Trennsäule mit wenigen Mikrometern Durchmesser verfügt. Über die gesamte Länge der Säule üben das Fließmittel und die darin gelösten Analyten intensive Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial aus, was letztendlich die Auftrennung der Analyten bewirkt. Auch wenn es sich bei einer HPLC aufgrund der Dimensionen nicht um ein mikrofluidisches System im eigentlichen Sinne handelt, so herrschen in der Trennsäule mikrofluidische Bedingungen mit Reynoldszahlen, die im Bereich von 0,004 bis 0,05 angenommen werden vor (Miyabe et al. 2010). Zudem beruht das Trennprinzip auf intensiven Wechselwirkungen des flüssigen Gemisches aus Analyten und Fließmittel mit der Oberfläche der Säule. Der Aufbau vieler mikrofluidischer Systeme lehnt an das Aufbauschema der HPLC an, wobei sich die Ausstattung mit einzelnen Komponenten nach dem Einsatzzweck und den Fertigungsmöglichkeiten richtet. Das wichtigste Element hierbei stellt die Pumpe dar, welche dem mikrofluidischen System die entsprechend benötigte Flüssigkeit liefert.

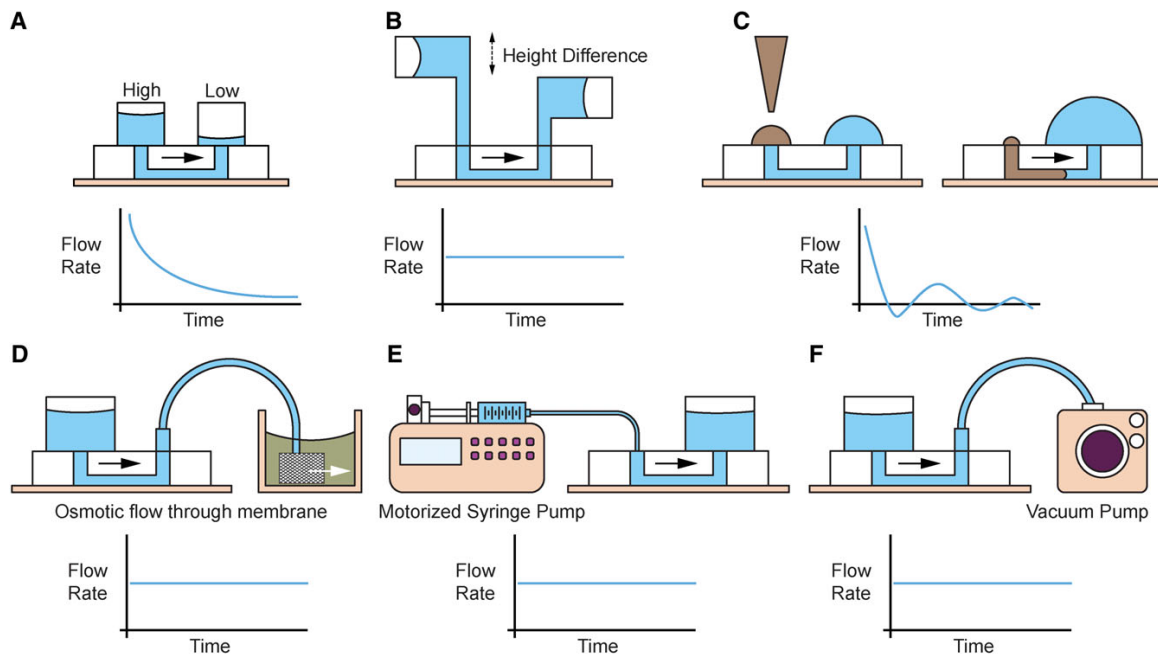


Abb. 2-2: Pumpprinzipien in mikrofluidischen Systemen. Passive Pumpprinzipien (A-D). A: Flüssigkeit fließt vom Reservoir mit hohem hydrostatischen Druck zum Reservoir mit niedrigem hydrostatischen Druck. Mit der Zeit sinken Druckdifferenz und Flussrate. B: Bei konstanter Differenz zweier hydrostatischer Drücke bleibt die Flussrate ebenfalls konstant. C: Fluss aufgrund unterschiedlich großer Oberflächen. Die Oberfläche des kleinen Flüssigkeitstropfens (grau) ist spezifisch größer als die des großen Tropfens (blau). Aus der Oberflächenspannung resultiert das Bestreben nach Oberflächenverkleinerung und damit Tropfenwachstum. Hieraus entsteht ein Fluidstrom in Richtung des größeren Tropfens. D: Fluidstrom durch osmotischen Druck in Richtung des Reservoirs mit hypertonem Medium. **Aktive Pumpprinzipien (E und F).** E: Eine Spritzenpumpe fördert das Medium durch das Flusssystem. F: Eine Vakuumpumpe zieht das Medium vom Reservoir zur Pumpe. Dieser Aufbau besitzt den Vorteil, dass sich weniger störende Luftblasen im System bilden bzw. leichter entfernt werden können (modifiziert nach Byun et al. 2014).

Man unterscheidet zwischen aktiven, d.h. mit elektrischer Energie betriebenen und passiven Pumpprinzipien, welche sich beispielsweise die Gravitationskraft, den osmotischen Druck und die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten zu Nutze machen (Abb. 2-2; Byun et al. 2014). Die Art der verwendeten Pumpe entscheidet wesentlich über die Art des Flussprofils. Die meisten aktiven Pumpen erzeugen einen pulsatischen Flüssigkeitsstrom, der entweder gezielt für physiologische Fließprofile wie pulsierenden arteriellen Blutfluss genutzt wird oder aber vermieden werden muss, da hierdurch aufgrund der geringen Flüssigkeitsvolumina das Fließprofil gestört wird. Da viele mikrofluidische Systeme mit externen Spritzenpumpen arbeiten, ist es daher ratsam, Modelle mit pulsationsfreiem Fluss (z.B. neMESYS, cetoni GmbH, D-Korbußen) zu verwenden. Ein gänzlich anderer Ansatz sind Hybridsysteme, in denen Kardio-myozyten aktiv unter Sauerstoff- und Glucoseverbrauch Membranen oder Mikrosäulen bewegen und einen pulsatischen Flüssigkeitsstrom erzeugen (Abb. 2-3). Obwohl dieses Prinzip in Hinblick auf die Zellkultivierung in mikrofluidischen Systemen den *in vivo*-

Verhältnissen sehr nahe kommt, unterscheiden sich theoretisch berechnete und experimentell bestimmte Flussraten um eine bis zwei Größenordnungen, nicht zuletzt weil die Flussrate in solchen Systemen von Faktoren wie Mediumzusammensetzung, Anordnung der Zellen sowie deren Ursprung abhängt (Pilarek et al. 2011).

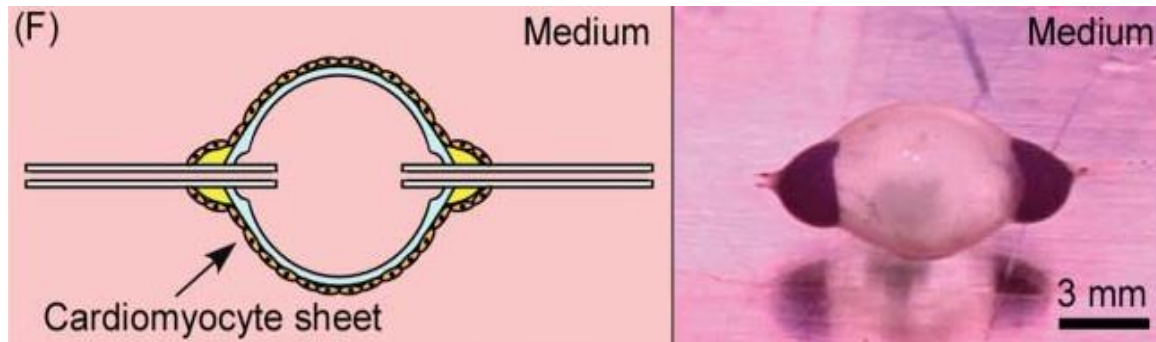


Abb. 2-3: Aufbau einer mittels Kardiomyozyten betriebenen Mikropumpe. Links: Schemazeichnung. Die Kardiomyozyten wachsen auf einer kugelförmigen PDMS-Schicht, die einen Hohlkörper formt, welcher von zwei Teflonkapillaren durchzogen wird. Kontraktion der Zellen sorgt für eine Volumenkontraktion des Hohlkörpers, wodurch das Medium durch die Kapillaren bewegt wird. Rechts: Fotografie der Mikropumpe (Tanaka et al. 2007).

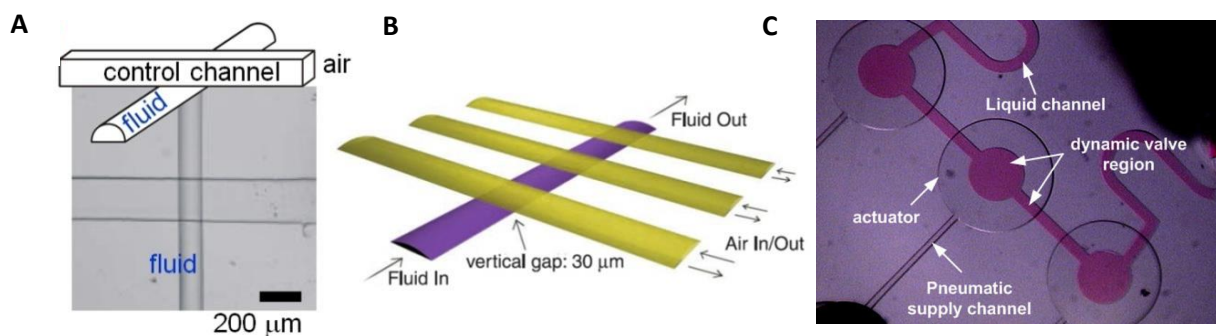


Abb. 2-4: A: Flusskanal mit pneumatisch gesteuertem Ventil, Foto und Schemazeichnung. B: Darstellung des Prinzips. Senkrecht zum Flusskanal (violett) verlaufen Luftkanäle (gelb). Eine Erhöhung des Luftdruckes in den Luftkanälen bewirkt den teilweisen bis kompletten Verschluss des Flusskanals. C: Foto eines Mikrofluidischen Systems mit einem Flusskanal und drei pneumatisch betriebenen Ventilen (modifiziert nach Au et al. 2011a).

In mikrofluidischen Systemen kommt je nach Systemanforderungen eine Vielzahl von Sensoren (lat. sentire, dt. fühlen, empfinden) zum Einsatz, um bestimmte Parameter erfassen und z.B. den Verlauf chemischer Reaktionen mittels Konzentrationsänderungen beurteilen zu können. Dabei wird hauptsächlich auf optische und elektrochemische Sensoren zurückgegriffen, z.B. um die Absorption von Licht bestimmter Wellenlängen oder um mit

Hilfe von Mikroelektroden die Leitfähigkeit des Mediums zu bestimmen. Im Gegensatz hierzu setzen Aktuatoren elektrische, thermische oder optische Signale in mechanische Arbeit um. Hierzu zählen insbesondere Mikropumpen und –ventile zur Steuerung des Fluidflusses (Au et al. 2011a, Abb. 2-4). Weiterhin kommen zum Trennen von Feststoffen und Flüssigkeit Filter, sowie zum Vereinigen unterschiedlicher Flüssigkeiten Mischersysteme zum Einsatz (siehe hierzu Suh und Kang 2010, Lee et al. 2011). Einige dieser Elemente sind in den folgenden Abschnitten über Mikrobioreaktoren (Abschnitt 2.2.1) und Säugerzellkultivierung in mikrofluidischen Systemen (Abschnitt 2.2.2) als Beispiele gezeigt.

2.1.3 Materialien und Herstellungstechniken

Die in der Mikrofluidik verwendeten Materialien und Herstellungstechniken richten sich nach dem Einsatzzweck des Systems. Parallel zur Anwendung in der Halbleitertechnologie kam zunächst Silizium zum Einsatz, welches sich jedoch wegen seiner Härte, seiner Sprödigkeit, sowie mangelnder optischer Transparenz nur für wenige mikrofluidische Anwendungen eignet. In dieser Hinsicht zeigte sich Glas dem Silizium überlegen, jedoch lassen sich mikrofluidische Strukturen auch in diesem Werkstoff nur sehr aufwändig, z.B. mittels Flusssäureätzung einbringen, was besondere Anforderungen an die Arbeitssicherheit stellt und eine Belastung der Umwelt bedeutet (Nge et al. 2013). Einen großen Fortschritt brachte die Entwicklung der Softlithografie in den Bell Laboratories 1974 (Berthier et al. 2012). Mit diesem Verfahren lassen sich nach Fertigung einer Abdruckform, dem sog. Master, nahezu beliebig viele Abdrücke aus Polymeren anfertigen, welche die auf dem Master als Erhebungen vorliegenden mikrofluidischen Strukturen als Vertiefungen aufweisen (Abb. 2-5). Damit war es möglich, mikrofluidische Systeme kostengünstig in großer Stückzahl anzufertigen und die Hauptentwicklungsarbeit von der Produktion solcher Systeme auf deren Anwendung zu verlegen. Wichtigstes und in der Forschung bei weitem am häufigsten verwendetes Polymer ist seit Beginn der 1990er Jahre Polydimethylsiloxan (PDMS), ein hydrophobes Elastomer auf Silikonbasis. Es zeichnet sich durch optische Transparenz vom UV- bis zum NIR-Bereich aus, ist chemisch inert, gaspermeabel und nicht toxisch. Zudem ist es durch den relativ geringen Elastizitätsmodul von PDMS möglich, eine Vielzahl mikrofluidischer Komponenten wie Ventile aus PDMS zu fertigen, welche auf diesem Wege direkt in ein mikrofluidisches System integriert werden können (Araci und Quake 2012). Von Nachteil sind seine schlechte Benetzbarkeit mit Wasser, welche zusammen mit der

Gaspermeabilität die Formierung von Luftblasen in Mikroflussskanälen fördert, sowie die Absorption organischer Lösungsmittel und ein Aufquellen infolge dessen. Auch über die Abgabe von nicht vernetzten Monomeren in das Umgebungsmedium sowie die Absorption niedermolekularer hydrophober Moleküle wie Steroidhormone wurde berichtet (Regehr et al. 2009). Dennoch eignet es sich sehr gut für chemische und biologische Anwendungen in der Mikrofluidik, besonders weil es sich mittels Sauerstoff-Plasmabehandlung hydrophilisieren lässt, was ein festes Anheften an Glasoberflächen, das sog. Bonden, ermöglicht (Abb. 2-6).

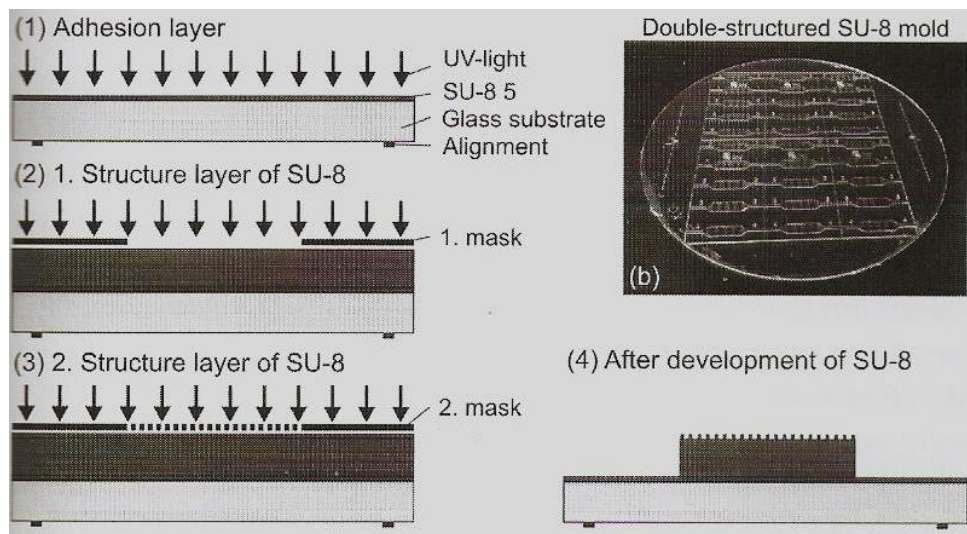


Abb. 2-5: Herstellung einer Maske für die Abformung gemusterter Mikrobioreaktoren aus PDMS. Eine Glasplatte wird zunächst mit dem Photolack SU-8 beschichtet und nach Exposition mit UV-Licht, welches die Polymerisierung einleitet, bei 95 °C gehärtet (1). Die Viskosität des Photolacks wird herstellerseitig mit einem Index dargestellt, der von 5 (niedrigste Viskosität) bis 50 (höchste Viskosität) reicht. Je geringer die Viskosität umso dünner ist die resultierende Lackschicht und umso dünner/feiner die spätere Struktur des PDMS-Abgusses. Die zweite Schicht SU-8 repräsentiert Form und Volumen des späteren Mikrobioreaktors, indem sie durch eine passende Maske UV-belichtet wird und dadurch aushärtet (2). Für das Muster wird eine 3. Schicht SU-8 aufgetragen und mit einer 2. Maske, die die Musterstruktur abbildet, belichtet (3). Nach dem Aushärten erfolgt das Entfernen von nicht belichtetem, nichtpolymerisiertem SU-8 (4). Das Foto darüber zeigt die fertige Abgussform für das PDMS (Demming 2011).

Polyfluoropolyether-diol-methacrylat (PFPE-DMA) und warmgehärtetes Polyester (TPE) stellen Weiterentwicklungen des PDMS dar, welche transparent, aber weniger elastisch sind. Da für die industrielle Fertigung robuste Thermoplaste dem PDMS überlegen sind, finden hier eher Polystyrol, Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas), Polycarbonate (PC), Polyethylenglycoldiacrylat (PEGDA), zyklische Olefinpolymere (COC) und Polyurethane (PU) Anwendung (Nge et al. 2013).

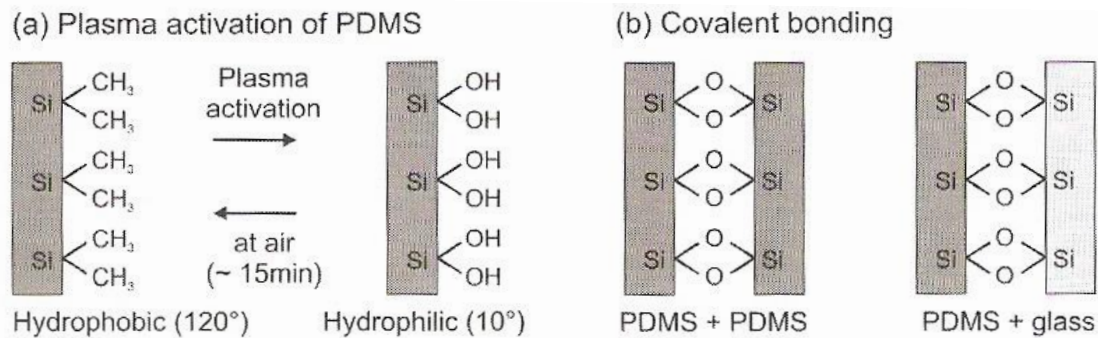


Abb. 2-6: a) Schematische Darstellung der Struktur von PDMS mit anschließender Umwandlung der Siloxan- in hydrophile Silanolgruppen mittels Sauerstoffplasma. Die Reaktion ist bei Raumtemperatur reversibel. b) Hydrophilisiertes PDMS lässt sich entweder miteinander oder an Glas binden. Dabei gehen die Hydroxylgruppen der Silanolgruppen unter Sauerstoffplasma kovalente Bindungen ein (Demming 2011).

Von besonderem Interesse ist die Verwendung von Papier in der Mikrofluidik, da es überall auf der Welt kostengünstig aus dem nachwachsenden Rohstoff Holz hergestellt werden kann und als Filtermaterial und zur simplen Papierchromatographie bereits etablierter Laborbestandteil ist. Weitere Vorteile sind die weiße Eigenfarbe, die durch guten Kontrast Farbreaktionen leicht erkennbar macht, die Bioabbaubarkeit, die Möglichkeit der chemischen Modifizierung der Hydroxylgruppen der Cellulose, sowie das einfache Aufbringen von Reagenzien und Wachskanälen zur Fließregulation mittels Tintenstrahldruck (Abb. 2-7 A, Cate et al. 2015). Ein besonderes Polymer stellt Zein dar, welches aus Maisproteinen gewonnen wird und mit dem sich ebenfalls mikrofluidische Strukturen herstellen lassen (Abb. 2-7 B, Luecha et al. 2011). Trotz einer Gelbfärbung und Autofluoreszenz bei Anregung mit blauem Licht lassen sich hieraus exakte Mikrostrukturen formen und der Verwendung als Einmalartikel stehen keine ökologischen Bedenken im Weg.

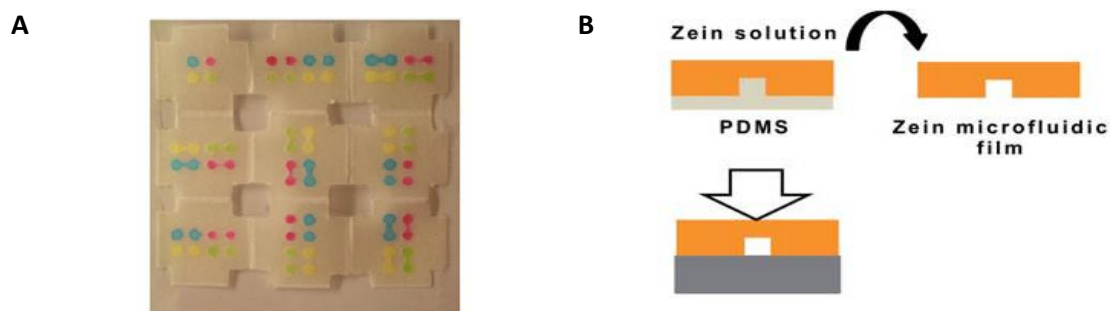


Abb. 2-7: A: Mikrofluidischer Assay auf Papier. Zusätzlich zum kompakten Aufbau lassen sich die neun Ebenen übereinander falten, was in einer zusätzlichen Platzersparnis resultiert (Cate et al. 2015). B: Herstellung eines Mikrofluidischen Kanals aus Zein. Die Zeinlösung wird auf eine Form aus PDMS gegossen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen resultiert ein Mikrokanal (schwarzer Pfeil), welcher mittels Druck auf einer Glasplatte befestigt werden kann (modifiziert nach Luecha et al. 2011).

2.1.4 Beispiele für Anwendungsgebiete mikrofluidischer Systeme

Hauptanwendungsgebiet mikrofluidischer Systeme ist die chemische Analytik. Bekanntestes Beispiel ist die Dünnschichtchromatografie, bei der Stoffgemische auf einer zentimetergroßen Kieselgelplatte mit Hilfe eines Fließmittelgemisches aufgetrennt werden. Die Bewegung des Fließmittels wird dabei passiv durch Kapillarkräfte vermittelt, welche durch die große spezifische Oberfläche des Kieselgels zustande kommen. In der Synthesechemie bieten mikrofluidische Systeme neben einem allgemein geringeren Reagenzienverbrauch auch den Vorteil, dass verschiedene Reaktionen parallel in getrennten Bereichen auf einem sog. Chip ablaufen können, was einen Gewinn an Zeit und Information hervorbringt (Dittrich und Manz 2006). Die Unterbringung verschiedener chemischer Grundoperationen wie Mischen, Filtrieren und Detektieren führt zu einem sog. Lab on a chip, d.h. zu einem kompakten mikrofluidischen System, mit dem sich chemische Analysen durchführen lassen. Denkbare Anwendungsgebiete hierfür wären z.B. die Pathogenanalytik in der Lebensmittelchemie (Yoon und Kim 2012).

Ein wichtiges Betätigungsfeld der Mikrofluidik ist die Molekularbiologie, denn um die enorme Menge an Informationen über das Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom einer einzelnen Zelle zu entschlüsseln sind platz- und ressourcensparende Techniken unverzichtbar. So führt die schnelle Wärmeübertragung in mikrofluidischen Systemen zu effektiver steuerbaren Thermozyklen bei der DNA-Amplifikation und mittels Parallelisierung ist es möglich, bis zu 1,5 Mio. Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) auf einem Chip durchzuführen (Szita et al. 2010).

Die geringe Größe mikrofluidischer Systeme macht sie transportabel, mit dem Ziel Analysen direkt am Ort der Probengewinnung durchführen zu können. Dies hat in der Medizin zur Einführung der *point of care* (POC) Analytik geführt, mit deren Hilfe binnen Minuten direkt am Patienten diagnostisch wichtige Laborwerte bestimmt werden können (Jung et al. 2015). Bekanntestes Beispiel aus dem ambulanten Bereich ist die Blutglucosemessung mittels Teststreifen (Contour next[®], Accu chek aviva[®]), bei der ein einzelner Blutropfen als Probenvolumen ausreichend ist. Der Teststreifen stellt dabei ein mikrofluidisches System dar, welches die zellulären Bestandteile vom Blut trennt und in dem das Plasma eigenständig mittels Kapillarkräften in den Bereich fließt, in dem die Glucose mittels Glucoseoxidase oxidiert und das entstehende Wasserstoffperoxid elektrochemisch oder photometrisch quantifiziert wird (Cha et al. 2015, Abb. 2-8 A). Patienten, welche mit oralen

Antikoagulanzen vom Coumarin-Typ (Marcumar®) behandelt werden, messen den Gerinnungsparameter Prothrombinzeit, ausgedrückt als *international normalized ratio* (INR), teilweise selbst (CoaguChek®). Die dabei eingesetzten Teststreifen arbeiten mit wenigen Mikrolitern Blut, welches auf dem Teststreifen mit Thromboplastin in Kontakt kommt. Dieses Enzym katalysiert eine Peptidspaltung, welche ein elektrochemisches Signal erzeugt (Wieloch et al. 2009). Je mehr Zeit dabei bis zur Detektion des Signals vergeht, umso größer ist der INR und umso langsamer gerinnt das Blut.

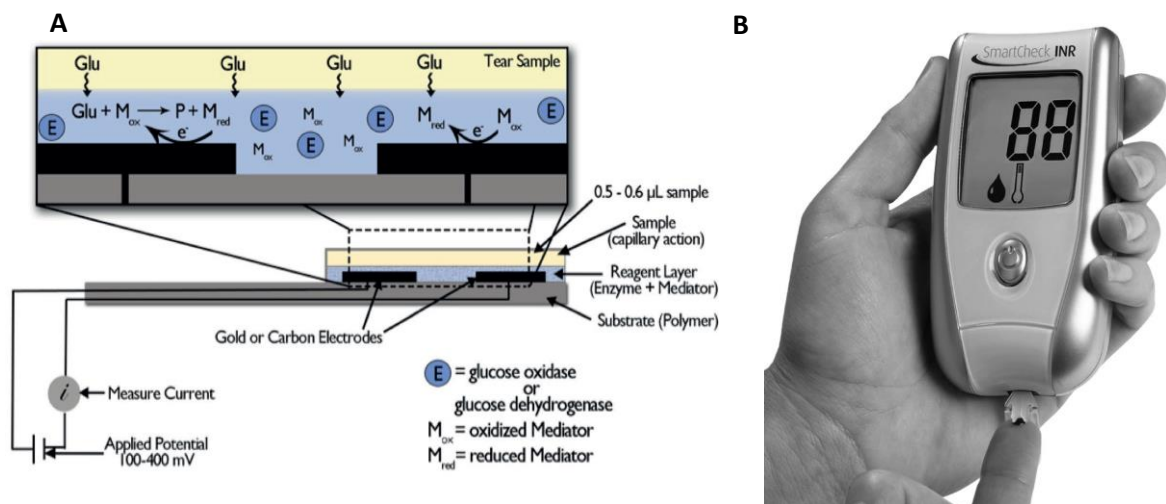


Abb. 2-8: A) Schematische Darstellung eines Blutglucose-Teststreifens, welcher zur Bestimmung des Glucosegehaltes von Tränenflüssigkeit genutzt wird. Die Glucose wird enzymatisch oxidiert, was an zwei Goldelektroden zu einem messbaren elektrischen Potential führt (Cha et al. 2015). B) Messgerät zur ambulanten Messung des INR-Wertes unter der Therapie mit oralen Antikoagulanzen (Gardiner et al. 2008).

Bei der Proteinanalytik spielt der Nachweis von humanem Choriongonadotropin (hCG) mittels Antikörper im weiblichen Urin als Frühtest auf eine Schwangerschaft eine wichtige Rolle. In der klinischen Diagnostik sind neben dem Nachweis von Entzündungsmarkern wie Creatinkinase (CK) und kardialem Troponin I bei akutem Myokardinfarkt Änderungen des Blutbildes von großem Wert, die auf eine Vielzahl an Erkrankungen hinweisen können (Apple et al. 1999). Hierzu zählen Leukämien bei erhöhter Leukozytenzahl, Anämien bei Defekten der Erythrozyten, zirkulierende Tumorzellen, die auf Metastasen hindeuten, sowie fetale Zellen zur pränatalen Diagnostik von Erbkrankheiten (Autebert et al. 2012). Mikrofluidische Systeme bieten sich hier an, um Blutzellen nach ihren physikalischen Eigenschaften wie Größe, Form und Dichte zu trennen (Yu, Z. T. F. et al. 2014) oder Tumorzellen nach selektiver Bindung mit Antikörpern aus einer Zellgrundmasse anzureichern (Liu et al. 2013).

Mikrofluidische Systeme sollen zudem in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Arzneimittelentwicklung leisten. Schwerpunkte liegen dabei auf der Erzeugung von Konzentrationsgradienten, um sowohl verschiedene Arzneimittelkonzentrationen, z.B. von Antibiotika, auf ihre Effekte zu prüfen (Vyawahare et al. 2014) als auch Hypoxien zur Nachbildung der Umgebung eines Tumors zu erzeugen (Peng et al. 2013). Dabei macht man sich zunutze, dass das Mischen zweier Komponenten in mikrofluidischen Systemen wie in Abschnitt 2.1 erwähnt ausschließlich mittels Diffusion möglich ist. Die Kultivierung mehrerer verschiedener Zelllinien auf einem Chip dient dazu, die Wechselwirkung der einzelnen Organe im menschlichen Körper unter Arzneimiteleinahme *in vitro* nachzubilden (sog. *Body-* oder *Human-on-a-chip*). So müssen Prodrugs wie das Zytostatikum Cyclophosphamid erst über den hepatischen Metabolismus in ihre aktive Wirkform überführt werden. Der Mediumfluss sorgt dabei für den Transport zwischen den einzelnen Zellarten, welche zugleich einen *in vivo*-ähnlichen Scherstress erfahren (Sung und Shuler 2010; Sung et al. 2010; Selimović et al. 2013; Bhise et al. 2014). Hierauf wird in Abschnitt 2.2.2 näher eingegangen, während die Entwicklung von Mikrobioreaktoren als Screeninginstrumente zur biotechnologischen Wirkstoffgewinnung im folgenden Abschnitt dargestellt wird.

2.2 Mikrofluidische Systeme zur Kultivierung von Zellen

2.2.1 Mikrobioreaktoren

Ein Bioreaktor ist ein abgeschlossenes Gefäß, in dem unter Vermittlung von Enzymen oder Mikroorganismen und unter definierten Bedingungen chemische Reaktionen ablaufen, die zu einem gewünschten Produkt, z.B. einem bestimmten Protein führen. Die Vielzahl an Produktionsparametern wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffkonzentration sowie an möglichen Produktionsstämmen von Mikroorganismen setzt im Vorfeld zur Großproduktion ein Screening im Labormaßstab voraus. Die hierzu eingesetzten Schüttelflaschen mit einem Volumen von 0,5 bis 5 L benötigen jedoch viel Platz und eine relativ große Menge an Nährmedium und Reagenzien. Die Reinigung und Sterilisation ist aufwändig und mit hohem Energieverbrauch verbunden. Aus diesen Gründen wird eine gezielte Miniaturisierung dieser Apparaturen angestrebt (Pasirayi et al. 2011). Ein erster Ansatz hierzu war die Kultivierung von *Escherichia coli* Bakterien in einer Polystyrolküvette mit 2 mL Volumen unter aktiver Begasung und mit integrierter optischer Erfassung der Kultivierungsparameter pH-Wert,

Sauerstoffanteil sowie optischer Dichte als Maß für die Menge an bakterieller Biomasse (Kostov et al. 2001). Wachstum und Stoffwechsel der Bakterien waren ähnlich im Vergleich zur Referenzkultur in einer 1 L Schüttelflasche. Die geringen Unterschiede wurden auf eine fehlende Temperaturkontrolle und einen im Vergleich zur Schüttelflasche geringeren Einfluss des Rührers auf die Durchmischung der Kulturbede zurückgeführt.

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, welche im Jahr 2003 bekannt gegeben wurde, forcierte weitere Aktivitäten auf dem Gebiet der Miniaturisierung von Bioreaktoren, da nun die Frage im Raum stand, welche Rolle die auf den 20500 humanen Gensequenzen codierten Proteine spielen (An Overview of the Human Genome Project 2014). Für Zwecke des Hochdurchsatzscreenings (HTS) erfolgte deshalb die Entwicklung von Mikrobioreaktoren (μ BR) als günstige Einmalartikel auf Basis von PDMS oder PMMA (s. Abschnitt 2.1.1) mit einem Volumen zwischen 50 und 800 μ L und integrierten Sensoren, welche die wichtigsten Kultivierungsparameter on-line und nichtinvasiv erfassen. Zwar wären für Screeningzwecke auch Mikrotiterplatten geeignet, diese ermöglichen jedoch nur eine *batch*-Kultivierung, bei der kein Austausch des Nährmediums stattfindet. Im μ BR sind jedoch auch eine *fed batch*-oder eine kontinuierliche Kultivierung möglich. Erstere zeichnet sich durch kontinuierlichen Zustrom von frischem Nährmedium zu den Mikroorganismen aus, während bei letzterer eine kontinuierliche Zugabe von Medium und Entnahme von Produkt erfolgt. Abb. 2-9 zeigt exemplarisch den schematischen Aufbau eines solchen μ BR-Systems für die aerobe Kultivierung von *E. coli* in einem Volumen von 150 μ L (Schäpper et al. 2009). Die Zufuhr frischen Mediums erfolgt aus der Peripherie. Das aktive Durchmischen der Kultivierungsbrühe wird mittels eines Mikromagnetrührers realisiert. Leuchtdioden liefern monochromatisches Licht verschiedener Wellenlängen für die Erfassung von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Bakteriendichte mittels Photodetektoren, welche die Absorption von Anregungslicht oder die Emission von Fluoreszenzlicht erfassen. Dies ist problemlos möglich, da sowohl PDMS als auch PMMA im Bereich von UV bis NIR optisch transparent sind. Schließlich erfolgen die Ansteuerung der LEDs sowie die Auswertung der Signale der Photodetektoren in der Peripherie mittels EDV. Das Ziel einer on-line-Analytik ist die Vermeidung regelmäßiger Probennahmen. Zum Beispiel benötigt die HPLC-Analytik Volumina von ca. 10 μ L. Dies würde die Menge an Kultivierungsbrühe im μ BR stark verringern und damit die Kultivierungsbedingungen stark beeinflussen. Zusätzlich bestünde eine erhöhte Kontaminationsgefahr, sodass stets eine *on-line*-Analytik für die wichtigsten Kultivierungsparameter angestrebt wird.

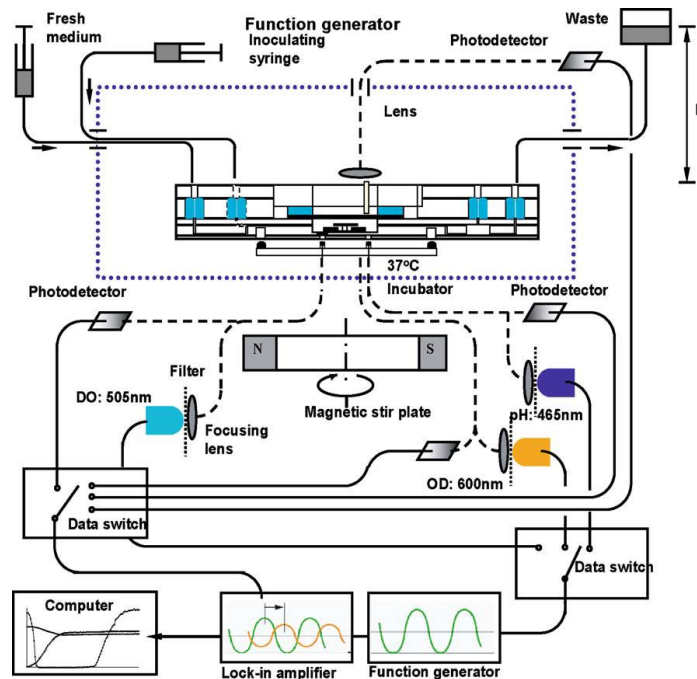


Abb. 2-9: Schematische Darstellung eines Mikrobioreaktorsystems. Der Mikrobioreaktor befindet sich in einer temperierten Umgebung (blau gepunkteter Rahmen) und wird aus der Peripherie mit frischem Medium versorgt. In dieser Darstellung erfolgt das Durchmischen der Kultivierungsbrühe aktiv mittels Magnetrührer. Weitere periphere Elemente sind Dioden, die Licht verschiedener Wellenlängen emittieren (LEDs), Linsen und Photodetektoren sowie EDV zum Ansteuern der einzelnen Module und Aufnehmen von Messdaten (Schäpper et al. 2009).

Neben *E. coli* können in μ BR auch Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) und bestimmte Algenarten (*Cyclotella cryptica*), die bei der Gewinnung von Biokraftstoffen eine zentrale Rolle spielen, kultiviert werden (Au et al. 2011b). Auch anaerobe Keime wie der Methanbildner *Methanosaeta concilii* lassen sich in solchen mikrofluidischen Systemen bis zu 8 Wochen lang kultivieren, wobei u.a. durch die vorherrschende laminare Strömung ein Konzentrationsgradient von Ammoniumionen im Kultivierungsraum erzeugt wird (Steinhaus et al. 2007). Die absolute Konzentration an Ammoniumionen sollte für den betrachteten Organismus zwischen 250 und 500 mg/L liegen. Zur Charakterisierung des Auskeimverhaltens der Sporen des Schlauchpilzes *Aspergillus ochraceus* erfolgte in der Forschergruppe mikroPART die Entwicklung eines 5-gliedrigen Mikrokammersystems mit integrierten Auslesegittern, die die nichtinvasive Beobachtung der Sporen unter einem Lichtmikroskop sowie die Untersuchung verschiedener Kultivierungsparameter wie z.B. pH-Wert ermöglicht (Abb. 2-10A, Demming et al. 2011). Das Auskeim- und Wachstumsverhalten unterschied sich nicht von der Schüttelflaschenkultur, wobei ein für optimales Auskeimen nötiger pH-Wert von 5,5 bestimmt wurde.

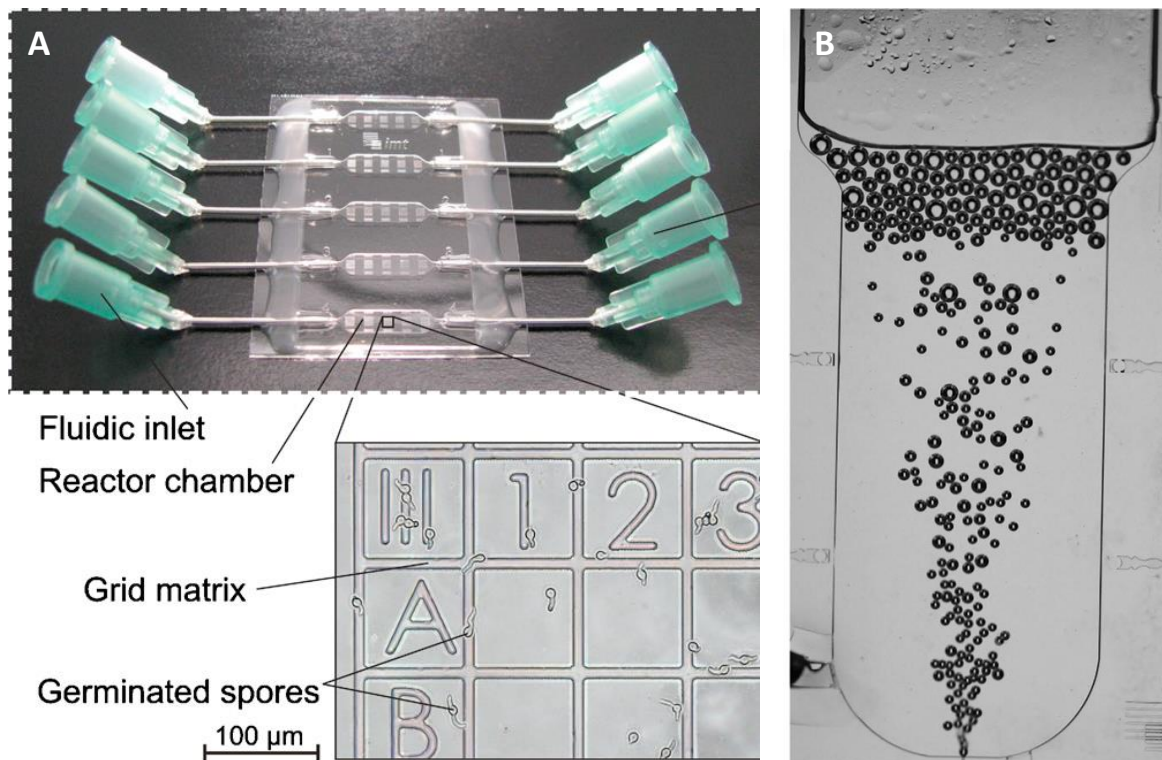


Abb. 2-10: A: 5-gliedrige μ BR-Anordnung mit integriertem Auslesegitter zur Untersuchung des Auskeimverhaltens von Sporen des Schlauchpilzes *Aspergillus ochraceus* (vergrößerter Bildausschnitt, Demming et al. 2011). B: Mikroblasensäule im vertikalen μ BR (Peterat et al. 2014).

Wesentliche Herausforderungen beim Betrieb vom μ BR sind die oftmals mangelhafte Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen trotz guter Gasdurchlässigkeit von PDMS, Temperaturschwankungen durch die im Verhältnis zum Volumen sehr große Oberfläche sowie eine ungenügende Durchmischung der Kultivierungsbrühe (Schäpper et al. 2009). Dadurch hervorgerufene Inhomogenitäten führen zu lokaler Nährstoffknappheit und verfälschten Messwerten. Wie stark sich das Wachstumsverhalten von *E. coli* ändern kann, wenn nur kleine Änderungen am μ BR vorgenommen werden, wird in einer Arbeit von Szita et al deutlich: Durch Verzicht auf die PDMS-Einfassung einer Lichtleitfaser auf dem μ BR verringerte sich der Diffusionsweg des Sauerstoffs durch das PDMS zum μ BR-Inneren, was wahrscheinlich der Grund für die anschließend höhere Wachstumsrate der Bakterien war (Szita et al. 2005). Temperaturschwankungen wurden hier vermieden, indem die parallele Anordnung von 8 μ BR in einem Aluminiumgehäuse auf einem Wasserbad positioniert wurde. Verglichen mit einer kommerziell erhältlichen Screening-Apparatur wurde bei gleichem Wachstumsverhalten deutlich weniger Stellfläche im Labor benötigt. Problematisch bei diesem System sind jedoch zum einen die Temperierung der μ BR-Außenfläche durch das Wasserbad, da Glas und PDMS schlechte Wärmeleiter sind und Temperaturänderungen nur

verzögert umgesetzt werden. Zum anderen muss der Mikrorührer für die aktive Durchmischung präzise gefertigt sein, wobei er anfällig für Störungen ist und die Durchmischung im Großreaktor zu ungenau imitiert, da dort zusätzlich die Begasung für Konvektion sorgt.

Im Rahmen des mikroPART-Projektes erfolgte deshalb die Entwicklung eines vertikalen μ BR mit integriertem Mikroheizelement auf Indium-Zinnoxid-Basis (ITO) und einer Mikrodüse zur Erzeugung von Luftblasen, welche für eine ausreichende Sauerstoffversorgung und Mediumdurchmischung sorgen und die Sedimentation von *S. cerevisiae*-Zellen verhindern sollten (Abb. 2-10B, Demming et al. 2012). Um ein Anhaften der hydrophoben Zellen an der PDMS-Wand sowie eine Koagulation der Luftblasen zu verhindern, wurde das PDMS hydrophilisiert und mit mehreren Polyelektrolytschichten beschichtet. Zur Temperierung des Systems auf 30 °C war eine Leistung von lediglich 0,2 W nötig und ein stabiler Blasenstrom entwickelte sich in einem Bereich von 5 bis 20 mL Gasfluss pro Stunde. Der Vergleich mit der Kultivierung in einer 500 mL Schüttelflasche ergab eine nur unwesentlich geringere Wachstumsrate. Das System wurde in einigen Punkten verbessert und die Blasenbildung sowie die Sauerstoffverteilung in einer Folgearbeit detailliert charakterisiert (Peterat et al. 2014). Trotz intensiver Forschung hat bislang kein μ BR Einzug in die industrielle Forschung gefunden (Hegab et al. 2013).

2.2.2 Bioreaktoren und mikrofluidische Systeme zur Kultivierung von Säugerzellen

Im Zuge des Tissue Engineering, dem gezielten Aufbau von Gewebemodellen und Gewebeimplantaten *ex vivo*, spielen Bioreaktoren mittlerweile auch eine wichtige Rolle bei der Kultivierung von Säugetierzellen. Im Vergleich zur submersen Kultivierung in Mikrotiterplatten besitzen Bioreaktoren einige wesentliche Vorteile: Beginnend bei der Zelleinsaat sorgt eine kontinuierliche Mediumkonvektion für eine homogene Zell- und Nährstoffverteilung. Im Laufe der Kultivierung wirken sich physikalische Stimulationen bei vielen Zellarten positiv auf die Zelldifferenzierung aus (Martin et al. 2004).

Der Aufbau des Bioreaktors richtet sich streng nach der Art der eingesetzten Zellen und des zu kultivierenden Gewebes. Somit werden neben dem klassischen Rührreaktor auch Hohlfaser-, Wandrotations- und Perfusionsreaktoren eingesetzt (Ebrahimkhani et al. 2014). Für den Labormaßstab ist bereits eine Reihe von kommerziellen Produkten erhältlich.

Beispielsweise bietet die Firma MINUCCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH aus Bad Abbach Strömungskammern in verschiedenen Ausführungen an, in denen die Kultivierung von Geweben unter permanentem Mediumzufluss- und Abfluss erfolgt. Eine erfolgreiche Gewebekultivierung mit solchen Apparaturen erfordert im Vorfeld nicht nur genaue Kenntnisse über die physiologischen Bedingungen, denen das Gewebe *in vivo* ausgesetzt ist, sondern auch eine Vielzahl an Voruntersuchungen, in denen die optimalen Kultivierungsbedingungen in Erfahrung gebracht werden müssen (Harink et al. 2013). Hierbei können wiederum mikrofluidische Systeme aus den in Abschnitt 2.2.1 genannten Gründen einen wertvollen Beitrag leisten. Wichtige organspezifische Anwendungen betreffen dabei bislang neben pluripotenten Stammzellen mesenchymale Zellen aus dem Herz- und Kreislaufgefäßsystem, sowie Epithelzellen verschiedenster Körperregionen. Im Folgenden wird die Kultivierung von Epithelzellen unter Mediumfluss im physiologischen Zusammenhang erläutert.

Epithelgewebe grenzen das Körperinnere nach außen ab und schützen es vor potentiellen Schadstoffen aus der Umgebung, indem sie z.B. dichte Zell-Zell-Verbindungen, sog. Tight-junctions ausbilden, mit Hilfe von Drüsenzellen Schleim absondern oder diesen zusätzlich mit beweglichen Zilien abtransportieren. Dies ist im Atemwegsystem mit Nasenschleimhaut-, Bronchial- und Alveolarepithelzellen von besonderer Bedeutung. Sie werden durch aktiv ein- und ausgeatmete Luft nicht nur mechanisch beansprucht, sondern müssen zusätzlich Krankheitserreger oder Partikel am Vordringen ins Körperinnere hindern. Auch nasal und pulmonal applizierte Arzneistoffformulierungen können die Zellen potenziell schädigen. Zentraler Anspruch der Kultivierung von Epithelzellen des Atemwegsystems in mikrofluidischen Systemen ist die Ausbildung einer physiologischen Luft-Medium-Grenze mit Hilfe von Membranen, auf denen die Zellen wachsen und sowohl mit Flüssigkeit als auch mit Luft umströmt werden. Mit Hilfe eines Mikrosystems zur Kultivierung humaner nasaler Epithelzellen (hNECs) konnte beispielsweise die Wirkung verschiedener Formaldehydverdünnungen in Luft auf den Zilienschlag der Zellen untersucht werden, wobei durch die kontinuierliche Umströmung die Möglichkeit bestand, das Formaldehyd mit reiner Luft wieder auszuwaschen (Wang et al. 2014). Eine solche Reinigung findet ebenfalls mittels Zilien statt, die bei der *in-vitro*-Kultivierung von Zellen in Mikrotiterplatten an der Luft-Medium-Grenze zwar ausgebildet werden können, jedoch ist ihre Bewegung häufig unkoordiniert; in mikrofluidischen Systemen bietet die gerichtete Umströmung der kultivierten Bronchial- und Trachealepithelzellen mit Luft die Koordination des Zilienschlags in eine bevorzugte Richtung (Trieu et al. 2014).

Am Beispiel der Luft-Medium-Grenze zeigt sich auch, dass Epithelgewebe polarisiert ist, d.h. die Zellen besitzen eine dem Körperinneren zugewandte basolaterale und eine der äußeren Umgebung zugewandte apikale Seite. An vielen Stellen des Körpers werden diese Zellen mechanisch beansprucht, z.B. durch die Bewegung des Nahrungsbreis im Magen-Darm-Trakt, durch Lidschlag und Tränenfluss am Auge sowie Schweißabsonderung und Wundsekretion der Haut. Während sich dieser physiologische Fluss bei der Kultivierung der Zellen in Mikrotiterplatten nicht nachstellen lässt, ermöglichen mikrofluidische Systeme eine Zellkultivierung unter Strömungsbedingungen und ermöglichen somit eine Anpassung der *in-vitro*-Bedingungen an physiologische Verhältnisse (Polacheck et al. 2013). Neben der Kultivierung von Endothelzellen aus arteriellen oder venösen Blutgefäßen sollen die physiologischen Verhältnisse in den Nieren und im Dünndarm modelliert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass IMCD-Zellen (primary rat inner medullary collecting duct cells) im mit einem Scherstress von 0,1 Pa durchströmten Mikrosystem höher wuchsen und weniger empfindlich auf durch Wasserstoffperoxid hervorgerufenen oxidativen Stress reagierten als Zellen, welche unter Ruhebedingungen kultiviert wurden (Jang und Suh 2010). Durch Nachweis von Aquaporin 2 (AQP2) und der Na-K-Pumpe auf entgegengesetzten Seiten der Epithelzellschicht konnte, anders als unter Ruhebedingungen, eine physiologische Polarisierung des Epithels im Mikrosystem belegt werden (Abb. 2-11).

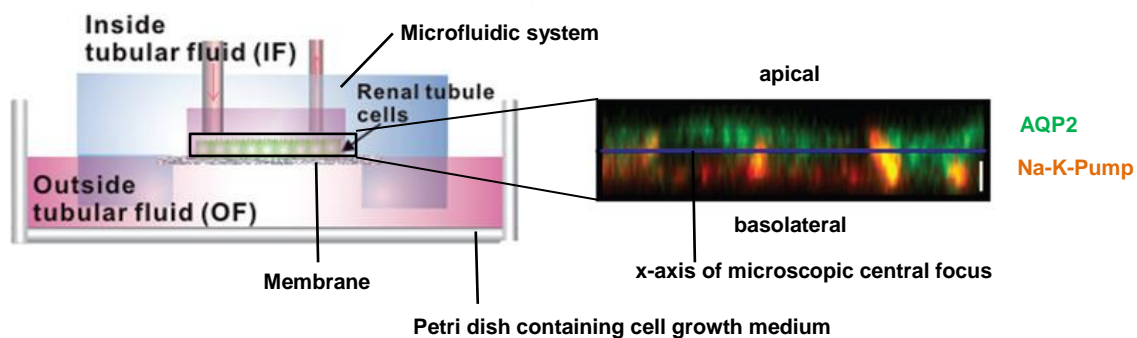


Abb. 2-11: Kultivierung von IMCD-Zellen im mikrofluidischen System nach Jang et al. Eine Polyestermembran teilt die Flusskammer in zwei Kompartimente auf. Die bewachsene Seite wird umströmt, während die nicht bewachsene Seite in Medium taucht. Die der Strömung direkt ausgesetzte Zellseite bildete das apikale Markerprotein Aquaporin 2 aus (Ausschnitt, grün), während in den membranseitigen Zellbereichen als basolaterales Markerprotein die Na-K-Pumpe (Ausschnitt, rot) immunologisch nachgewiesen werden konnte. Modifiziert nach Jang und Suh 2010.

Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass HREC (human renal epithelial cells) und MDCK-Zellen (madin darby canine kidney) in kompartimentierten Systemen unter Scherstress von 0,1 Pa Tight-junction-Proteine wie das ZO-1 (zonula-occludens, lat. dichte Verbindung) und primäre Zilien wie das Alpha-Tubulin, welches als Rezeptor für mechanische Stimulation fungiert, exprimieren (Ferrell et al. 2010). Die Funktion der Tight-junction-Barriere konnte anhand der Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER) im Mikrosystem und der Undurchlässigkeit für FITC-markiertes Inulin belegt werden, wobei die TEER-Werte mit ca. $150 \Omega/\text{cm}^2$ vergleichbar mit anderen Untersuchungen in Mikrosystemen waren (Douville et al. 2010). Untersuchungen zum Metabolismus von MDCK-Zellen in durchströmten Mikrosystemen zeigten einen gesteigerten Glucoseverbrauch mit zunehmender Mediumflussrate (Baudoin et al. 2007). Die höchste Wachstumsrate wurde bei einer Flussrate von $10 \mu\text{L}/\text{min}$ beobachtet, was einem Scherstress von 0,003 Pa im System entsprach.

Am Beispiel der Zelllinie Caco-2 konnte in einem Mehrkammer-Mikrosystem gezeigt werden, dass die Co-Kultivierung mit dem physiologischen Darmkeim *Lactobacillus rhamnosus* ausschließlich im Mikrosystem (Abb. 2-12) unter einer kontinuierlichen Fluidströmung möglich war (Kim et al. 2012). In einer Folgearbeit wurden weitere Unterschiede zur Kultivierung unter Ruhebedingungen untersucht: Unter Flussbedingungen und unter Nachbildung der Darmmotilität bildeten die Zellen Krypten aus, sezernierten geringe Mengen an Mucus und exprimierten CYP3A4, welches unter Ruhebedingungen nicht nachgewiesen werden konnte (Kim und Ingber 2013).

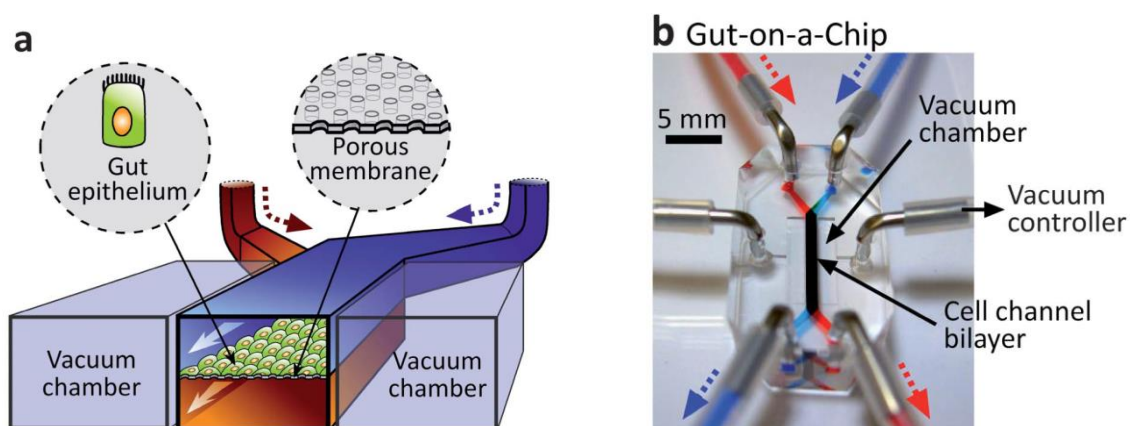


Abb. 2-12: a) Schematischer Aufbau eines Mikrosystems zur Nachbildung physiologischer Bedingungen im humanen Dünndarm. Caco-2 Zellen werden auf einer Membran kultiviert und von beiden Seiten mit Kultivierungsmedium umströmt. Zwei Vakuumkammern ermöglichen die Nachbildung der physiologischen Darmmotilität. b) Foto des Mikrosystems mit den Ein- und Ausgängen für Kultivierungsmedium und zur Steuerung der Motilität (modifiziert nach Kim et al. 2012)

Kompartimentierte Mikrosysteme wie in Abb. 2-12 gezeigt, eignen sich auch für die Cokultivierung verschiedener Zellarten, wobei es auch möglich ist, auf die aufwändige Membranintegration zu verzichten und eine der beiden Zellarten in eine Gelmatrix zu immobilisieren und von der jeweils anderen Zellart zu trennen. So konnte gezeigt werden, dass MDCK-Zellen ebenfalls an Zellhöhe zunehmen, wenn sie in einem mit 0,05 Pa durchströmten Mikrosystem zusammen mit multipotenten Stammzellen aus dem Fettgewebe von Ratten, welche in einer Kollagenmatrix eingebettet wurden, kultiviert wurden (Huang et al. 2011). Zudem wurden Systeme entwickelt, mit denen die perorale Aufnahme von 50 nm großen Polystyrol-Nanopartikeln nachgestellt und deren Interaktion mit Caco-2 und HepG2/C3 Zellen untersucht werden konnte. Dabei kamen die fluoreszenzmarkierten Partikel zunächst mit den vom Medium umspülten Caco-2 Zellen in Kontakt. Ein Teil der Partikel (9,5 %) konnte die als Begrenzung zum 2. Kompartiment dienende Caco-2 Zellschicht überwinden und mit den ebenfalls umspülten HepG2/C3 Zellen interagieren. Die Quantifizierung des aus membrangeschädigten Zellen ausgetretenen Enzyms Aspartat-Aminotransferase (AST) ergab, dass die HepG2/C3 Zellen bei Partikelkontakt mehr als doppelt soviel AST freisetzen, wenn sie mit Caco-2 Zellen cokultiviert wurden (Esch et al. 2014).

Im Hinblick auf die Barrierefunktion von Epithelzellen bei der Arzneistoffaufnahme darf die Haut nicht vernachlässigt werden. Für die Untersuchung der Permeation unterschiedlicher Arzneistoffe durch artifizielles Stratum corneum wurden Mikrosysteme entwickelt, die aus zwei Kammern aufgebaut sind aber nicht durchströmt werden. Eine mit einer Mischung aus Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden imprägnierte Polycarbonatmembran trennte als artifizielles Stratum corneum diese beiden Kammern (Zhang et al. 2013). Auch die Kultivierung von Hautäquivalenten und Haarfollikeln in durchströmten Mikrosystemen ist möglich. Dabei scheint die Integration von *ex vivo* Subcutis in Dermisäquivalente im Mikrosystem unter Fluss erfolgreicher zu verlaufen als unter Ruhebedingungen, was u.a. an einer geringeren Anzahl apoptotischer Zellen im Mikrosystem ersichtlich ist (Ataç et al. 2013). Aus der gleichen Arbeitsgruppe stammt ein System zur 28-tägigen parallelen Kultivierung von Dünndarm-, Leber- und Tubulusepithelzellen zusammen mit einem Hautäquivalent, welches zur Untersuchung von Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion (ADME) von Arzneistoffen dienen soll. Die erste Charakterisierung ergab sowohl eine konstante Freisetzung von Lactatdehydrogenase als auch konstante Glucosespiegel im ausströmenden Kultivierungsmedium, was auf gleichbleibende Zellteilungs- und Absterberaten sowie eine ausgeglichene Stoffwechsellage der Zellen

schließen lässt (Maschmeyer et al. 2015). Die Kultivierung von Epithelzellen in Mikrosystemen unter Flussbedingungen ermöglicht somit auf sehr kompaktem Raum die Nachbildung von Zellschichten, welche *in vivo*-ähnliche physiologische Funktionen besitzen.

2.3 Feste Lipidnanopartikel

2.3.1 Definition

Unter festen Lipidnanopartikeln (solid lipid nanoparticles, SLN) versteht man wässrige kolloidale Dispersionen fester Lipidteilchen mit einem Durchmesser unter 1000 nm (Müller und Lucks 1992). Gemeinsam mit festen Polymernanopartikeln, Liposomen, Nanoemulsionen und mizellaren Lösungen finden sie Verwendung als Arzneistoffträgersysteme zur potentiellen parenteralen, dermalen, peroralen, pulmonalen, nasalen Applikation schwer wasserlöslicher Arzneistoffe sowie als Impfstoffadjuvantien (Müller et al. 2000). Vorteile von SLN gegenüber anderen kolloidalen Arzneistoffträgern sind ihre geringe Toxizität durch Verwendung körperversandter Substanzen wie Lipide, Phospholipide und Gallensalze, die Möglichkeit einer retardierten Wirkstofffreisetzung sowie eine erhöhte Stabilität der Wirkstoffmoleküle im Inneren der Lipidmatrix (Mehnert und Mäder 2012).

2.3.2 Herstellungstechniken

Zur Herstellung von SLN-Dispersionen findet eine ganze Reihe verschiedener Verfahren Anwendung. Eines der ersten beschriebenen Verfahren ist die Herstellung von SLN mittels Abkühlung heißer Mikroemulsionen (Gasco, 1993). Der Vorteil des Verfahrens beruht auf dem geringen mechanischen Energieeintrag. Von Nachteil sind jedoch einerseits der relativ hohe Anteil an Emulgatoren (12-20 % (m/m)) und Coemulgatoren (3-7 % (m/m)) sowie andererseits der niedrige Anteil an disperser Phase an der Gesamtmasse der Zubereitungen. Aktuelle Untersuchungen an Mikroemulsionen zur Herstellung von SLN-Dispersionen beschäftigen sich u.a. mit dem Einfluss von Struktur und Zusammensetzung der Mikroemulsionen auf die Partikeleigenschaften (Fadda et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung von SLN ist die Lösungsmittlevaporation (Sjöström und Bergenstahl 1992), bei der die wirkstoffhaltige Lipidphase zunächst in einem organischen Lösungsmittel wie Cyclohexan oder Dichlormethan gelöst wird. Diese Lösung wird anschließend in der wässrigen Phase dispergiert und das noch enthaltene Lösungsmittel abgedampft. Auch bei diesem Verfahren ist besonders der thermische Energieeintrag gering, womit es sich gut für thermolabile Wirkstoffe eignet. Ein Nachteil stellt jedoch die Verwendung z.T. toxischer organischer Lösungsmittel dar. Dieses Problem wird bei der Membranemulgierung, bei der die geschmolzene Lipidmatrix entweder direkt oder schon vorhomogenisiert als Prämix durch eine Glasmembran in die wässrige Phase gedrückt wird, umgangen. Die angelegten Drücke sind relativ niedrig, jedoch ist die Prozesszeit mit mehreren Stunden relativ lang. Die Eigenschaften der produzierten Partikel sind stark abhängig von den Faktoren Lipidmatrixzusammensetzung, Emulgatorart und -Anteil, Prozessdruck und verwendete Membran (Joseph und Bunjes 2014).

Die verbreitetste Herstellungstechnik stellt die Hochdruckhomogenisation dar, die kalt oder warm erfolgen kann. Hierzu werden keine organischen Lösungsmittel benötigt und das Verfahren ist skalierbar, d.h. die Herstellung von Gebinden die mehr als 100 mL umfassen ist in kurzer Zeit möglich. Jedoch ist insbesondere bei der warmen Hochdruckhomogenisation der Energieeintrag durch Wärme und Kavitationskräfte sehr hoch, zudem sind spezielle Apparaturen nötig, die den technischen Aufwand erhöhen. Bei der warmen Hochdruckhomogenisation wird die Lipidmatrix zunächst aufgeschmolzen, anschließend wird die entsprechend temperierte wässrige Phase hinzugegeben und die Mischung vorhomogenisiert. Die daraus entstandene Präemulsion wird anschließend mittels Hochdruck homogenisiert. Das Endprodukt ist eine heiße Nanoemulsion, aus der beim Abkühlen durch Kristallisation der Lipidtröpfchen eine Nanosuspension entsteht (Mehnert und Mäder 2001). Zur Zeit näher untersucht werden die Auswirkungen der Variation der Prozessparameter Temperatur, Kühlrate und Emulgatoreinarbeitung auf die Wirkstoffstabilität (Hung et al. 2011) und Möglichkeiten der Mikronisierung des Herstellungsprozesses (Finke et al 2012). Bei der kalten Hochdruckhomogenisation werden zunächst alle Bestandteile der Lipidmatrix aufgeschmolzen und die homogene Schmelze durch rasches Abkühlen wieder erstarren gelassen. Nach dem Mahlen der Lipidmatrix wird diese in der wässriger Phase dispergiert und bei Raumtemperatur oder darunter homogenisiert (Mehnert und Mäder 2012). Des Weiteren kann zur Herstellung von SLN-Dispersionen die Mischung aus Lipidmatrix und wässriger Phase mittels Ultraschall homogenisiert werden, was im Vergleich zur

Hochdruckhomogenisation kleinere Partikel liefert, jedoch nur für kleine Ansatzgrößen anwendbar ist und die Zubereitung mit Metallionen kontaminieren kann (Silva et al. 2011).

2.3.3 Interaktion mit Zellen

Die Applikation von Arzneimitteln jedweder Form im Allgemeinen und SLN im Speziellen führt zwingend zu einer Interaktion mit den Gewebestrukturen des menschlichen Körpers. Die wichtigste Frage ist dabei die der toxischen Wirkung der Arzneiform auf den Organismus und seine einzelnen Zellen, nicht zuletzt, weil im Falle von SLN eine sehr große spezifische Oberfläche vorliegt, die sehr viel Raum für die Interaktion mit Zellen lässt. Für die parenterale Applikation von SLN aus Hartfett und Lecithin konnte gezeigt werden, dass im Hinblick auf eine intravenöse Gabe der Anteil hämolysierter Erythrozyten mit 2 % sehr niedrig liegt und für den Fall einer subkutanen Gabe die toxische Wirkung auf humane dermale Fibroblasten mit wachsendem Lecithinanteil steigt (Schubert und Müller-Goymann 2005). Dass die Zytotoxizität von SLN *in vitro* von der Zusammensetzung der Lipidmatrix abhängt, konnte auch in weiteren Arbeiten belegt werden (Petersen et al. 2011). Mit der isolierten Betrachtung einzelner Zellarten lässt sich jedoch keine Aussage über das Risikopotential von SLN treffen, da insbesondere Immunreaktionen, welche im Patienten schlimmstenfalls eine tödliche Schockreaktion auslösen können, von einer Vielzahl an verschiedenen Zellen ausgehen. Anhand von *in vivo* Versuchen und mit *ex vivo precision cut lung slices* (PCLS) von Mäusen konnte gezeigt werden, dass von SLN aus Hartfett und Lecithin nach Inhalation keine Zellschädigung ausgelöst wird (Nassimi et al. 2010a). Die Beladung von SLN mit dem PDE-5-Inhibitor Sildenafil zeigte, dass PCLS von Ratten hinsichtlich ihrer Vitalität, gemessen an der Produktion von Redoxäquivalenten, empfindlicher auf SLN reagieren als *precision cut heart slices* (PCHS) der gleichen Spezies (Paranjpe et al. 2013).

Informationen über die zelluläre Aufnahme von SLN werden benötigt, um aufzuklären wie die toxische Wirkung der Partikel zustande kommt. So konnte gezeigt werden, dass Mausmakrophagen Rhodamin-B-markierte SLN binnen wenigen Minuten phagozytieren, wobei die Maskierung der Partikel mit einer Polyethylenglycol-(PEG)-Oberfläche die Anzahl phagozytierter Partikel deutlich senkte (Bocca et al. 1998). Die endozytotische Aufnahme von SLN scheint jedoch vom jeweiligen Zelltyp abhängig zu sein, wobei die Art der Partikelmarkierung die Aussagekraft der Untersuchungen entscheidend beeinflusst. Es gibt

Hinweise auf die aktive Aufnahme von SLN, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI (s. Abschnitt 2.6) markiert wurden, durch murine L929 Zellen (Petersen et al. 2011), während die aktive Aufnahme Coumarin 6-markierter SLN durch humane Keratinozyten der Linie NCTC2544 nicht sicher belegt werden konnte (Plajnšek et al. 2011). Begründet wurde letzteres mit dem Übertritt des Coumarin 6 in die lipophilen Membranregionen der Zellen, weswegen durch Einfügen einer 14-C-Kette ein lipophileres Coumarinderivat synthetisiert wurde, welches durch intensivere Wechselwirkung mit der Partikelmatrix kaum in die Zellmembranen penetrieren sollte. Hiermit markiert schien die SLN von oben genannter Zelllinie nicht nur inkorporiert, sondern über interzelluläre Kanäle zwischen einzelnen Zellen transportiert zu werden (Kristl et al. 2013). Ob und in welchem Ausmaß SLN endozytotisch aufgenommen werden, sollte für jede Zellart einzeln untersucht werden. Trotz der Verwendung von zum Großteil physiologischer Substanzen ist das toxische Potential umso größer, je stärker die Interaktion mit Zellorganellen wie Mitochondrien ist. Zudem bedeutet eine geringe zelluläre Inkorporation, dass auf dem Weg der Partikel zum Zielort nur sehr wenig Wirkstoff verloren geht.

2.4 Liposomen

Liposomen sind Vesikel, die aus einer oder mehreren Phospholipiddoppelschichten aufgebaut sind. Im Vergleich zu SLN besitzen sie keinen festen Lipidkern. Sie stellen sehr vielseitige Arzneistoffträger dar, weil sich die inkorporierten Stoffe in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie innerhalb der Doppelschichten, im inneren wässrigen Kompartiment oder zwischen beiden verteilt aufhalten können (Torchilin 2005, Abb. 2-13).

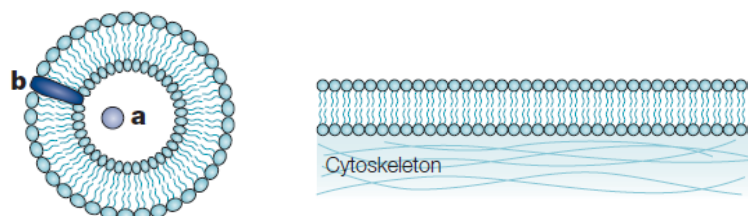


Abb. 2-13: Schematische Darstellung eines Liposoms mit inkorporiertem hydrophilen (a) und lipophilem (b) Arzneistoffmolekül. Durch die Ähnlichkeit zu Zellmembranen und die Verwendung körpereigener Ausgangsstoffe zur Herstellung gelten Liposomen als besonders verträgliche Arzneistoffträger (Torchilin 2005).

Zur Herstellung von Liposomen eignen sich u.a. Hochdruckhomogenisation, Membranextrusion, Ultraschall, Filmbildung sowie Dialyse mischmizellarer Strukturen (Ebrahim et al. 2005). Dabei entstehen in Abhängigkeit vom Verfahren, von den anliegenden Prozessbedingungen und Ausgangsstoffen unterschiedliche Liposomenstrukturen, die in Tabelle 2-1 gelistet sind.

Tabelle 2-1: Vielfach beobachtete Strukturen von Liposomen mit Durchmesser und Herstellungsverfahren, bei denen die genannten Strukturen am häufigsten vorkommen. Zusammenstellung nach Schubert 2010.

Struktur	Durchmesser	Herstellungsverfahren
Small unilamellar vesicles (SUV)	Kleiner 50 nm	Ultraschall, Hochdruckhomogenisation (instabil)
Large unilamellar vesicles (LUV)	Größer 50 nm	Membranextrusion
Multilamellar large vesicles (MLV)	100 nm bis mehrere μm	Hydratation nach Filmbildung
Multivesikular vesicles (MVV)	Größer 50 nm	Hydratation nach Filmbildung

Neben der Formulierung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe wie Amphotericin B (AmBisome[®]), werden Liposomen auch als eigenständige Wirkkomponenten, z.B. in Tränenersatzmitteln (Tears Again[®]) eingesetzt. Im Falle des mäßig wasserlöslichen Zytostatikums Doxorubicin konnte mit der Verwendung einer liposomalen Formulierung (Myocet[®]) das absolute Risiko des Auftretens kardialer Nebenwirkungen im Vergleich zu reinem Doxorubicin um 15 Prozentpunkte gesenkt werden (Batist et al. 2001). Somit werden mittels Liposomen nicht nur neue Therapieoptionen ermöglicht, sondern auch bestehende entscheidend verbessert.

2.5 Nanoemulsionen

Lipidnanoemulsionen wurden in den 1960er Jahren im Hinblick auf die totale parenterale Ernährung entwickelt, bei der Nährstoffe und Energielieferanten intravenös appliziert werden. Triglyceride aus langkettigen (LCT) und mittelkettigen Fettsäuren (MCT), welche als

phospholipid-stabilisierte Tröpfchen vorliegen, fungieren dabei als Hauptenergielieferanten (Bunjes 2010). Wenn diese Emulsionstropfen als Arzneistoffträger genutzt werden sollen, stehen eine Solubilisation von Wirkstoffen, deren Schutz vor Hydrolyse und Oxidation, eine verminderte Plasmaproteinbindung oder eine retardierte Freisetzung im Vordergrund (Floyd 1999). Neben der Emboliegefahr, wegen der die maximale Tröpfchengröße maximal 5 μm betragen darf, birgt die intravenöse Applikation von Fettemulsionen die Risiken von DNA-Schäden durch Peroxide ungesättigter Fettsäuren und Verstärkung von Entzündungsvorgängen durch eine vermehrte Zufuhr von Ausgangsmaterial für die Biosynthese von Arachidonsäure und den aus ihr hervorgehenden Eicosanoiden (Hippalgaonkar et al. 2010). Um die Autoxidation ungesättigter Fettsäuren zu verhindern, werden deshalb Antioxidantien wie Vitamin E zugesetzt.

Beispiele für Arzneistoffe, die aufgrund guter Lipidlöslichkeit als Fettemulsion parenteral appliziert werden, sind Diazepam (Diazepam lipuro[®]), Dexamethason-21-palmitat (Lipotalon[®]) und Propofol (Bunjes 2010).

2.6 Modellarzneistoffe für nanoskalige Arzneistoffträger

Modellarzneistoffe stellen Moleküle dar, die hinsichtlich Molekulargewicht und Löslichkeit den Wirkstoffen ähneln, die formuliert werden sollen. Häufig handelt es sich um fluoreszierende und in niedriger Konzentration detektierbare Moleküle. Mit ihnen lässt sich die Eignung nanoskaliger Strukturen als Arzneistoffträger prüfen. Besonders berücksichtigt werden dabei die Beladungskapazität und das Freisetzungsverhalten.

Fluorescein-Derivate sind häufig verwendete Modellarzneistoffe mit Vertretern wie Fluorescein-Natrium, welches hydrophile Wirkstoffe imitiert, die als Salz vorliegen. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) eignet sich zur Markierung von Dextranen, die als hochmolekulare Modellarzneistoffe ebenso wie das niedermolekulare Fluorescein-Natrium zur Untersuchung des parazellulären Transports in *in-vitro*-Permeationsstudien an Gewebemodellen eingesetzt werden (Wengst und Reichl 2010). Farbstoffe aus der Gruppe der Rhodamine wie Rhodamin 123 sind zusätzlich Substrate für das p-Glycoprotein, welches ein Effluxtransporter darstellt und maßgeblich an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist (Bejugam et al. 2008, Seetharaman et al. 1998). Im Unterschied zu den bereits genannten Modellarzneistoffen ist das fluoreszierende Doxorubicin ein pharmakologisch

aktiver Wirkstoff. Sein Vorteil liegt in der Verknüpfung eines an Krebszelllinien messbaren pharmakologischen Effektes mit der Möglichkeit, die zelluläre Aufnahme des Wirkstoffes fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen (Spillmann et al. 2014). Ist jedoch nur die Lokalisation von Formulierungen von Interesse, erscheint dieser Modellarzneistoff wegen seiner Toxizität ungeeignet.

Coumarin 6 ist ein häufig verwendeter lipophiler Modellarzneistoff, dessen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient 5,42 beträgt (Lombry et al. 2002). Er eignet sich somit hervorragend sowohl für die Einarbeitung in Arzneistoffträgersysteme auf Lipidbasis als auch in Systeme auf Polymerbasis wie PLGA-Partikel (Eley et al. 2004). Abb. 2-14 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren von Coumarin 6 in Ethanol und Methanol. Durch die Absorption von blauem und die Emission von grünem Licht ist der Farbstoff mit den üblichen Filtern von Fluoreszenzmikroskopen detektierbar.

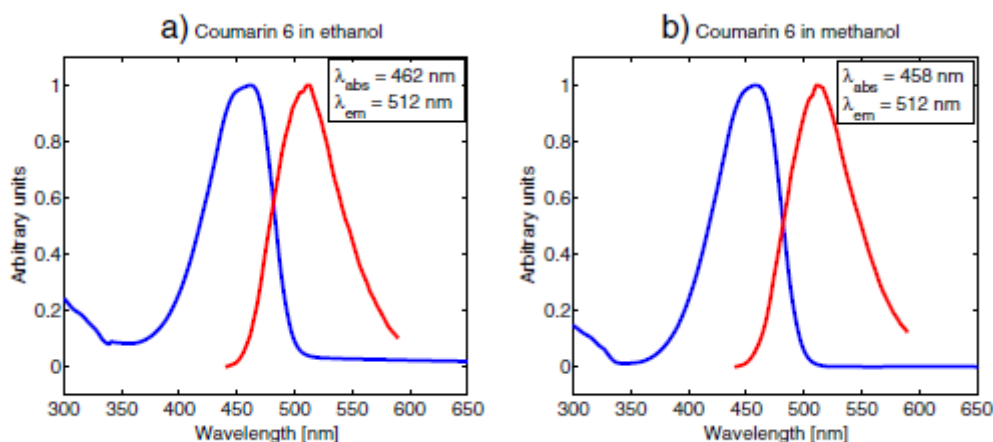


Abb. 2-14: Absorptions- und Emissionsspektren von Coumarin 6 in ethanolischer (a) und methanolischer Lösung (b, Kristoffersen et al. 2014).

Besondere Bedeutung besitzt Coumarin 6 bei der Charakterisierung seiner chemischen Umgebung. So konnte gezeigt werden, dass die Quantenausbeute des Farbstoffes besonders hoch ist, wenn er mit aggregierten Proteinen interagiert (Makwana et al. 2011). Mit Hilfe des Stokes-Shift, der Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, konnte nachgewiesen werden, dass sich Coumarin 6 in SLN-Formulierungen aus Hartfett und Phospholipiden in der Grenzschicht zwischen Lipidkern und Phospholipidhülle befindet (Finke et al. 2014). Grundsätzlich ist jeder Fluoreszenzfarbstoff als Modellarzneistoff geeignet. Er sollte hinsichtlich Lipophilie und Molekulargewicht den verwendeten Arzneistoffmolekülen so weit wie möglich ähneln.

2.7 Verfahren zur Untersuchung der Interaktion nanoskaliger Arzneistoffträger mit Säugerzellen unter Flussbedingungen

2.7.1 Zell-Partikel-Interaktion unter Flussbedingungen

Die Interaktion partikulärer Arzneistoffträger mit Zellen unter Flussbedingungen *in vitro* zu untersuchen, erklärt sich aus dem Vorhandensein verschiedenster mechanischer Beanspruchungen der epithelialen und endothelialen Gewebe im menschlichen Körper. Diese kommen durch die Umströmung mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe, sowie Sekreten wie Mucus und Tränen zustande und werden auch durch die Bewegung von Körperteilen wie Augenlidern oder Nahrungsbrei hervorgerufen. Durch die Zunahme von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der westlichen Bevölkerung stellen die gezielte Bereitstellung wirkstoffbeladener Nanopartikel in Bereichen entzündeten Blutgefäßendothels sowie die Untersuchung der Thrombozytenbindung an Gefäßendothelzellen wichtige Themengebiete dar. So wurden Polystyrolnanopartikel mit Liganden der endothelialen Zelladhäsionsmoleküle (ECAM) E- und P-Selektin vermehrt an HUVEC gebunden, welche mit Interleukin- β , einem Entzündungsmediator, aktiviert wurden (Blackwell et al. 2001). Unter Flussbedingungen zeigte sich in einem Scherstressbereich von 0,15 bis 0,9 Pa auf E- und P-Selektin exprimierenden CHO-Zellen mit zunehmendem Scherstress eine abnehmende Partikelanreicherung. Da im Gegensatz zu Polystyrolpartikeln solche aus PLGA im menschlichen Körper abgebaut werden können und somit weniger risikobehaftet sind, erfolgten ähnliche Studien mit PLGA-Nanopartikeln, die mit dem Glucocorticoid Dexamethason beladen und einer Sequenz des P-Selektin-Liganden Glycoprotein Ib konjugiert waren (Kona et al. 2012). Hierin wurden Human aortic endothelial cells (HAEC) einem Scherstress bis 2 Pa unterworfen und mit Histamin aktiviert. Auch hier eine bevorzugte Anlagerung konjugierte Nanopartikel an die Zellen statt, wobei diese mit zunehmendem Scherstress und zunehmender Partikelgröße abnahm. Im Gegensatz hierzu zeigte die Arbeitsgruppe um Volkov et al, dass HUVEC bei der Aufnahme von CdTe-Quantenpunkten einer mittleren Partikelgröße von 50 nm ein Aufnahmeoptimumoptimum zeigen, welches bei einem Scherstress von 0,5 dyn/cm² lag. Die Simulation einer Entzündung durch Inkubation mit dem Entzündungsmediator Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) verbesserte die Partikelaufnahme hingegen nicht (Prina-Mello et al. 2012).

Eine weitere Zielstruktur stellt das endotheliale vaskuläre Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) dar, durch das ligandengekoppelte Liposomen auch unter Flussbedingungen bevorzugt an

VCAM-1-exprimierende HUVEC gebunden wurden (Kusunose et al. 2013). Während sich diese Arbeiten mit der Frage der Adhäsion von Zellen oder Arzneistoffträgern an gesundes oder (in Folge einer Arteriosklerose oder eines Diabetes mellitus) entzündetes Endothelgewebe von Blutgefäßzellen befassen, stehen bei anderen Arbeitsgruppen die in der Praxis dominierende perorale Arzneistoffaufnahme im Vordergrund. So wurde ein Mikroflusssystem mit integriertem Schwinger entwickelt, der mit PLGA-Mikropartikeln versetztes Medium über einen Caco-2-Zellrasen pumpt. Partikel, welche mit Weizenkeim-Agglutinin beschichtet waren, adhärten trotz Mediumfluss stärker an den Zellen als solche, die mit Rinderserumalbumin beschichtet wurden (Fillafer et al. 2009). Umfangreiche Untersuchungen der Wechselwirkung von Liposomen und Silica-Nanopartikeln mit Maus-Myoblasten der Linie C2C12 zeigten, dass im Scherstressbereich von 0,0146 bis 0,146 dyn/cm² positiv geladene Partikel stärker an den Zellen haften blieben als negativ geladene Partikel. Bemerkenswert war zudem, dass bei 0,146 dyn/cm² mehr Liposomen mit den Zellen interagierten als bei 0,0146 dyn/cm² (Hosta-Rigau und Städler 2013).

2.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Bei der Untersuchung der Lokalisation von Partikeln auf Zellen gelangt die konventionelle Lichtmikroskopie schnell an ihre Grenzen, besonders wenn es um die Frage der Internalisierung der Partikel durch die Zellen geht. Die Problematik bei lichtmikroskopischen Aufnahmen besteht in der begrenzten Auflösung, weil das Licht von Strukturen der Probe außerhalb des Fokusbereiches reflektiert, gebrochen oder gebeugt wird. Die daraus resultierende Lichtstreuung führt zu unscharfen Abbildungen und mindert die optische Auflösung. Die Erfindung des Konfokalmikroskops durch Minski 1952 ermöglichte eine Steigerung des horizontalen und vertikalen Auflösungsvermögens (Paddock 1999). Grundlegendes Prinzip ist die Reduzierung der Lichtstreuung, indem das Licht durch eine Lochblende, das sog. Pinhole, geführt wird und nur einen µm-großen Punkt der Probe im Fokusbereich beleuchtet. Das komplette Bild entsteht durch Abtasten vieler einzelner Punkte nacheinander und dem anschließenden Zusammenfügen der einzelnen abgetasteten Probenbereiche am Computer. Die Möglichkeit der Anregung fluoreszenzaktiver Moleküle durch monochromatisches Laserlicht erhöht die Empfindlichkeit der Methode, weil durch die Emission von Fluoreszenzlicht das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht wird. Dabei wird Laserlicht über einen dichroitischen Spiegel zur Probe geführt, wo es Moleküle wie GFP,

Farbstoffe oder FITC-markierte Antikörper zum Fluoreszieren anregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht erreicht schließlich den dichroitischen Spiegel und wird durch ein zweites Pinhole zum Detektor geführt (Abb. 2-15). Die Möglichkeit, sehr dünne Probenbereiche beobachten zu können, macht die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie auch für die medizinische Diagnostik interessant. Neben der Pathologie (Turillazzi et al. 2008) findet sie Anwendung in der Ophthalmologie zur Untersuchung cornealer Zelldystrophien (Shukla et al. 2005). Durch das hohe Auflösungsvermögen der CLSM sind molekularbiologische Methoden wie die Funktionsaufklärung von Proteinen und ihrer Untereinheiten mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) möglich geworden (Gust et al. 2014). Hiermit lässt sich z.B. das Zusammenlagern von Enzymuntereinheiten untersuchen, indem an eine der Komponenten ein sog. Donorfluorophor gekoppelt wird, welches nach Anregung seine Energie an ein Akzeptorfluorophor, welches mit der zweiten Enzymkomponente verbunden ist, abgibt, wenn sich beide in entsprechender räumlicher Nähe befinden. Hierfür kommt eine Reihe von Fluorophoren in Frage, wobei die wichtigste Voraussetzung für FRET-Untersuchungen ist, dass sich das Emissionsspektrum des Donorfluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors hinreichend überschneidet. Dies ist der z.B. Fall bei 7-Aminocoumarinen und Rhodamin-6G (Seth et al. 2005).

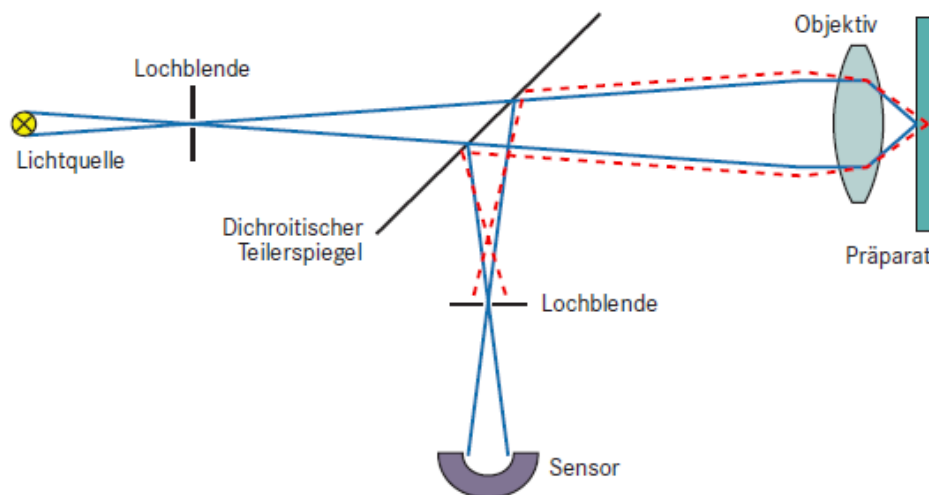


Abb. 2-15: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Das Anregungslaserlicht wird durch eine Lochblende geführt (links oben) und passiert anschließend den Dichroitischen Spiegel und das Objektiv. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Spiegel reflektiert und gelangt durch eine zweite Lochblende (unten) zum Detektor. Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene (rot gestrichelt) wird von der zweiten Lochblende am Durchtritt zum Sensor gehindert (Mulisch und Welsch 2010).

2.7.3 Mikrosysteme zur Untersuchung der okulären Arzneistoffaufnahme in vitro

Die lokale Bioverfügbarkeit von Augentropfen liegt bei unter 5 %. Lidschlag und ein Tränenfluss von bis zu 50 µL/min stellen die Hauptmechanismen dar, durch die der Arzneistoff nach der Applikation vom Auge entfernt wird. Die lokale Bioverfügbarkeit lässt sich durch bestimmte Anwendungstechniken wie Schließen des Augenlids für 5 Minuten in Kombination mit dem Verschließen des nasolacrimalen Drainageganges mittels Druck auf den Nasenknochen erhöhen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Techniken weder in Studien noch beim Patienten breite Anwendung findet (Flach 2008). Schwer wasserlösliche Arzneistoffe wie das Antiphlogistikum Rimexolon (Vexol® 1 %) oder das Antihistaminikum Levocabastin (Livocab®) liegen als Suspension vor und müssen vor der Anwendung geschüttelt werden (Alcon Pharma GmbH, Fachinformation Vexol 1 % Augentropfen; McNeil GmbH, Fachinformation Livocab Augentropfen). Bei Präparaten wie Diclo-Vision® oder Voltaren® ophtha liegt der Wirkstoff Diclofenac molekulardispers in Mizellen bzw. in Cyclodextrinen eingeschlossen vor (Rote Liste 2015 Diclo-Vision sine; Rote Liste 2015 Voltaren ophtha). Mizellen können jedoch das Auge reizen, während Cyclodextrine als Hilfsstoffe erhöhte Arzneimittelkosten verursachen. Das Makrolidantibiotikum Azithromycin ist wegen seiner schwachen Wasserlöslichkeit und einem logP-Wert von 4,02 als ölige Augentropfenformulierung auf Basis mittelkettiger Triglyceride im Handel (Cheung et al. 2015, Rote Liste 2015 Infectoazid 15 mg/mL). Diese Formulierung verlängert die Verweilzeit des Antibiotikums am Auge, was insofern nötig ist, als die Abtötungskinetik des Azithromycins sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist (Ackermann 2014). Von Nachteil sind jedoch eine Sichtbehinderung des Patienten durch die veränderten Lichtbrechungseigenschaften des Öls und ein vergleichsweise langsames Anfluten des Wirkstoffes infolge einer erhöhten Viskosität des Trägermediums. Eine Wirkstoffformulierung auf der Basis fester Lipidnanopartikel könnte hier Abhilfe schaffen, da hier bereits Hinweise auf eine retardierte Freisetzung für einige Wirkstoffe am Corneaäquivalent existieren (Attama et al. 2009). Ziel dieser Arbeit ist es, mit einem interdisziplinären Ansatz den Effekt von Tränenfluss und Lidschlag am Auge in einem Mikroflusssystem nachzustellen und die Übertragung eines fluorimetrisch detektierbaren Modellarzneistoffes auf humane Corneaepithelzellen zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Rezepturgrundstoffe

Hartfett: Beim verwendeten Hartfett Softisan 154[®] (S154) handelt es sich um hydriertes Palmöl, welches von Cremer Oleo (D-Witten) bezogen wurde.

Phospholipide: Die Phospholipide Phospholipon 90G[®] (PL90G), welches hochgereinigtes Sojalecithin darstellt und 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycerophosphatidylethanolamin (DHPE) wurden freundlicherweise von der Lipoid GmbH (D-Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt.

Die fluoreszenzmarkierten Phospholipide N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (F-DHPE) und N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (NBD-DHPE), jeweils als Triethylammoniumsalz vorliegend, wurden von PromoKine (D-Heidelberg) bezogen.

Emulgator: Das nichtionische Tensid Solutol HS15[®] (HS15) stellt Macrogol-15-hydroxystearat dar, welches von BASF (D-Ludwigshafen) bezogen wurde.

Fluoreszenzfarbstoffe: Die Fluoreszenzfarbstoffe 3-(2-Benzothiazolyl)-7-(diethylamino)coumarin (Coumarin 6, C6; Mr: 350,43 g/mol), 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI, Mr: 933,87 g/mol) und [9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenyliden]-diethylammoniumchlorid (Rhodamin B, RhB, Mr: 479,02 g/mol) wurden von Sigma Aldrich (D-Steinheim) bezogen. Die Strukturformeln des als orangefarbenes Pulver vorliegenden Farbstoffes Coumarin 6, des Indocyaninfarbstoffes DiI und des Rhodamin B sind in Abb. 3-1 dargestellt.

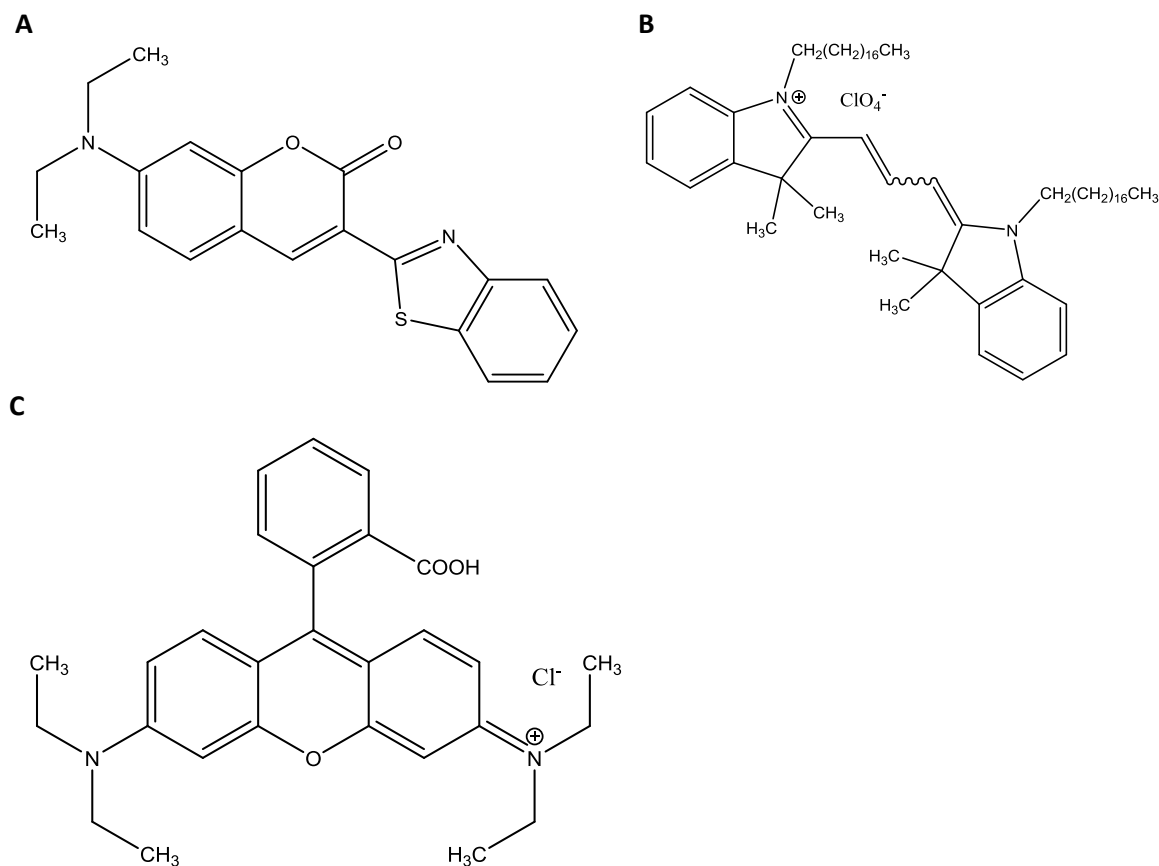


Abb. 3-1: Strukturformeln von Coumarin 6 (A), DiI (B) und Rhodamin B (C).

Wasser: Wasser wurde zur Formulierungsherstellung in bidestillierter Qualität verwendet. Verdünnungen für die Partikelgrößenbestimmung erfolgten mit Millipore® Wasser (Thermo Fisher Scientific, USA-Waltham).

3.1.2 Mikrobioreaktoren und Mikroflussskanäle

Die Entwicklung und Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Mikrobioreaktoren und Mikroflussskanäle erfolgte am Institut für Mikrotechnik der TU Braunschweig mittels Softlithographie und wird in der Dissertation von Stefanie Demming ausführlich beschrieben (Demming 2011). Zur Herstellung sei auf Abschnitt 2.1.1 und Abb. 2-5 verwiesen. Die Abmessungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroflussskanäle (Abb. 3-2) betrugen 27,7 x 4,0 x 0,15 mm (Länge x Breite x Höhe).

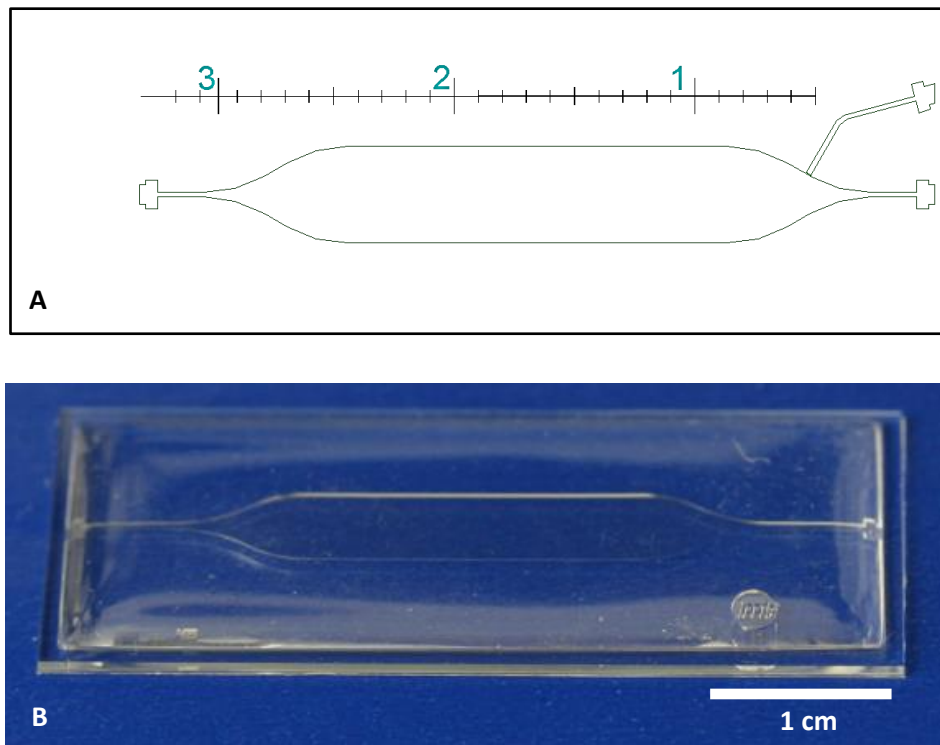


Abb. 3-2: Mikroflusskanal aus PDMS zur Kultivierung von Epithelzellen unter Flussbedingungen, A: Konstruktionszeichnung mit Skala für die Abmessungen, B: Fertiger Kanal aus auf Glas gebondetem PDMS (Quelle Zeichnung und Foto: T. Lorenz, Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig).

3.1.3 Gleichungen zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse

Hydraulischer Durchmesser D_h

$$D_h = 4 \cdot \frac{A}{U} \quad \text{Gl. 3-1}$$

Die Berechnung des hydraulischen Durchmessers D_h der Mikroflusskanäle erfolgte durch Division der vertikalen Kanalfläche A durch deren Umfang U mit anschließender Multiplikation mit dem Faktor 4 (Oertel et al. 2009).

Reynolds-Zahl Re

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\eta} \quad \text{Gl. 3-2}$$

Bei der Berechnung der dimensionslosen Reynolds-Zahl wurden die Parameter Mediumdichte ρ , Fließgeschwindigkeit v , hydraulischer Durchmesser D_h und dynamische Mediumviskosität η nach Gl. 3-2 ins Verhältnis gesetzt (Young und Simmons 2010).

Eintrittslänge Le

$$\frac{Le}{D_h} \approx \frac{0,6}{1 + 0,035 \cdot Re} + 0,056 \cdot Re \quad \text{Gl. 3-3}$$

Die Eintrittslänge beschreibt den Punkt in einem Kanal, ab dem nach einer Aufweitung oder Verengung das gesamte Strömungsprofil wieder ausgebildet ist und sich nicht mehr verändert (Young und Simmons 2010). Die Berechnung erfolgt nach Gl. 3-3 mit den Parametern hydraulischer Durchmesser D_h und Reynolds-Zahl Re .

Scherstress $\tau(H)$

$$\tau(H) = - \frac{2\eta \cdot \frac{3}{2} \cdot c(max)}{H^2} \cdot H \quad \text{Gl. 3-4}$$

Die Berechnung des Scherstress bzw. der Schubspannung $\tau(H)$ einer reibungsbehafteten Kanalströmung erfolgte nach Gl. 3-4 mit den Parametern dynamische Mediumviskosität η , der Kanalhöhe H , sowie der maximalen Geschwindigkeit der Rohrströmung $c(max)$ (Oertel et al. 2009). Im Unterschied zu Gl. 2-1 wird statt der Flussrate (m^3/s) die Mediumfließgeschwindigkeit (m/s) verwendet.

3.1.4 Verwendete Zelllinien

3.1.4.1 *Humane Cornea Epithelzellen (HCE-T)*

Zur Imitation der physiologischen Verhältnisse an der vorderen Augenhornhaut (Cornea) wurde auf Humane Cornea Epithelzellen (HCE-T) zurückgegriffen. HCE-T gehen zurück auf eine SV-40-immortalisierte Zelllinie, welche von Sasaki et al etabliert wurde (Sasaki et al 1995). Bezogen wurde sie von RIKEN cell bank (Tsukuba, Japan).

3.1.4.2 Humane Alveolarepithelzellen (A549)

Humane Alveolarepithelzellen (A549) stammen aus dem Alveolarkarzinom eines männlichen Patienten und ähneln den surfactant-produzierenden Alveolar-Typ-II-Zellen (Lieber et al. 1976). Die Zelllinie wurde freundlicherweise vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover zur Verfügung gestellt.

3.1.4.3 Humane Epidermiszellen (HaCaT)

HaCaT-Zellen repräsentieren eine spontan immortalisierte Hautkeratinozyten-Zelllinie, wobei das Akronym für „Human adult keratinocytes propagated under low Calcium conditions and elevated Temperature“ steht (Boukamp et al. 1988). Die Zelllinie wurde freundlicherweise vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt.

3.1.4.4 Murine Herzendothelzellen (MHEC5-T)

Murine Herzendothelzellen entstammen einem Mäuseherzkarzinom und wurden in DMEM kultiviert (Plendl et al. 1995). Die Zelllinie wurde freundlicherweise vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover zur Verfügung gestellt.

3.1.4.5 CaLu-3 Zelllinie

Die CaLu-3 Zelllinie entstammt dem humanen bronchialen Adenokarzinom eines Kaukasiers (Fogh et al. 1977) und bildet *in-vitro* einen dichten Zellrasen mit Tight-junctions, Zilien und Mucusproduktion (Florea et al. 2003).

Eine Zusammenfassung über die verwendeten Zelllinien und ihrer einzelnen Behandlung gibt Tabelle 3-1 wieder. Alle Kultivierungsmedien wurden von der Firma Biochrom, Berlin, bezogen.

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien, ihrer Ursprünge und Kultivierungsmedien

Zelllinie	HCE-T	A549	HaCaT	MHEC5-T	CaLu-3
Ursprung	Human, Cornea	Human, Alveolar- epithel	Human, Haut- keratinoyzten	Murin, Herzendo- thel	humanes Bronchial- karzinom
Kultivierungsmedium	DMEM + Ham's F12 1:1	DMEM	DMEM	DMEM	SIRC-1
Serumanteil	5 %	10 %	10 %	10 %	10 %

3.1.5 Allgemeine Kultivierungsbedingungen der Zelllinien

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung erfolgten unter einer Reinraumwerkbank (Heraeus, D-Hanau). Die verwendeten Hilfsmittel wurden vor ihrem Einsatz sterilisiert oder steril bezogen. Die Kultivierung aller Zellarten erfolgte submers in 25 cm²- und 75 cm²-Polystyrolflaschen (Sarstedt, D-Nümbrecht) in Zellkulturinkubatoren (Thermo Scientific, USA-Whatham) bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchte und einem CO₂-Anteil von 5 % (V/V). Der Wechsel des Kultivierungsmediums erfolgte bei allen Zellarten dreimal pro Woche, jeweils nach vorheriger Wachstumskontrolle unter dem Inversmikroskop Olympus IX50 (s. Abschnitt 3.2.2.1), mit dem mittels einer CCD-Kamera und einer 100 W Quecksilberdampf-Entladungslampe die Anfertigung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen möglich war. Die Passagierung erfolgte nach Erreichen von 80-100 % Konfluenz. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für die in Tabelle 3-2 zusammengefassten Zeiten mit einer 2 %igen EDTA-Lösung (MP Biomedicals, USA-Solon) und danach mit 2 mL einer Mischung aus Trypsin und EDTA (0,05 % bzw. 0,02 %, PAA-Laboratories, D-Cölbe) bei 37 °C inkubiert. Die zur Wiedereinsaat erforderliche Zellzählung erfolgte nach 1:20 Verdünnung mittels Coulter-Counter Z2 (Beckman Coulter, D-Krefeld).

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Passagierung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	HCE-T	A549	HaCaT	MHEC5-T	CaLu-3
EDTA-Inkubation	5 min	2 min	4 min	----	10 min
Trypsin-EDTA-Inkubation	7 min	4 min	6 min	2 min	20 min
Zellzahl in 25 cm ² -Flasche	80000	50000	250000	20000	5000

3.1.6 Zusammensetzung von Krebs-Ringer-Puffer (KRB)

Die Zusammensetzung des für die Umspülungsversuche selbst hergestellten Krebs-Ringer-Puffers (KRB) ist in Tabelle 3-3 wiedergegeben.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung von KRB

Bestandteil	Einwaage [g]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	6,80	116,36
KCl	0,40	5,37
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,14	1,01
NaHCO ₃	2,10	25,00
HEPES	3,58	15,02
D-Glucose-Monohydrat	1,10	5,56
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20	0,81
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,26	1,77
Aqua bidest.	Ad 1000 mL	----

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung kolloidaler Arzneistoffträger und Phasentrennung

3.2.1.1 Feste Lipidnanopartikel (SLN)

Zur Herstellung fester Lipidnanopartikel (SLN) wurde auf eine Mischung von 70 % (m/m) S154 und 30 % (m/m) PL90G zurückgegriffen, welche zur Herstellung einer homogenen Lipidmatrix bei 90 °C unter Rühren aufgeschmolzen und bei Raumtemperatur erstarren gelassen wurde (Schubert et al. 2006). Die Zusammensetzung der SLN-Formulierungen ist in Tabelle 3-4 dargestellt:

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der SLN-Formulierungen

Lipidphase			Wässrige Phase		
Bestandteil	Einwaage g	Anteil % (m/m)	Bestandteil	Einwaage g	Anteil % (m/m)
S154	0,525 g	70	HS15	0,143 g	1
PL90G	0,225 g	30	Aqua bidest	ad 14,25 g	99
Anteil an Formulierung	5 %		95 %		

Zur Herstellung der Präemulsion wurde die Lipidphase bei 70 °C aufgeschmolzen und die temperaturgleiche wässrige Phase unter Rühren ergänzt. Anschließend erfolgte die Prähomogenisierung der Mischung mit einem Ultra Turrax® (Ika, D-Staufen) für eine Minute bei 12.000 U/min. Die Herstellung der SLN erfolgte mittels Hochdruckhomogenisierung in einer im Rahmen der DFG-Forschergruppe mikroPART entwickelten Mikrokanalanlage (Abb. 3-3, Finke et al. 2012). Hierzu wurde jede Präformulierung mit einem Druck von 1250 bar in drei Zyklen durch eine in einem Mikrosystem positionierte Edelstahl-Doppelblende gedrückt. Die Blendenweite jeder Blende betrug 80 µm. Die anschließende Abkühlung bei Raumtemperatur sorgte für ein Erstarren der nanoskaligen flüssigen Lipidtröpfchen zu festen Lipidnanopartikeln. Zur Beladung bzw. Markierung der SLN erfolgte die Beimischung der in Tabelle 3-5 zusammengestellten Stoffe in den genannten Mengen zur Lipidmatrix, wobei sich die Farbstoffe Coumarin 6, DiI und Rhodamin B in der geschmolzenen Lipidmatrix lösten. Im Falle von F-DHPE und NBD-DHPE erfolgte eine der

Einwaage entsprechende Minderung des Lecithinanteils in den Formulierungen, wobei die Einarbeitung durch gemeinsames Aufschmelzen mit den Lipidmatrixkomponenten bei 90 °C erfolgte.

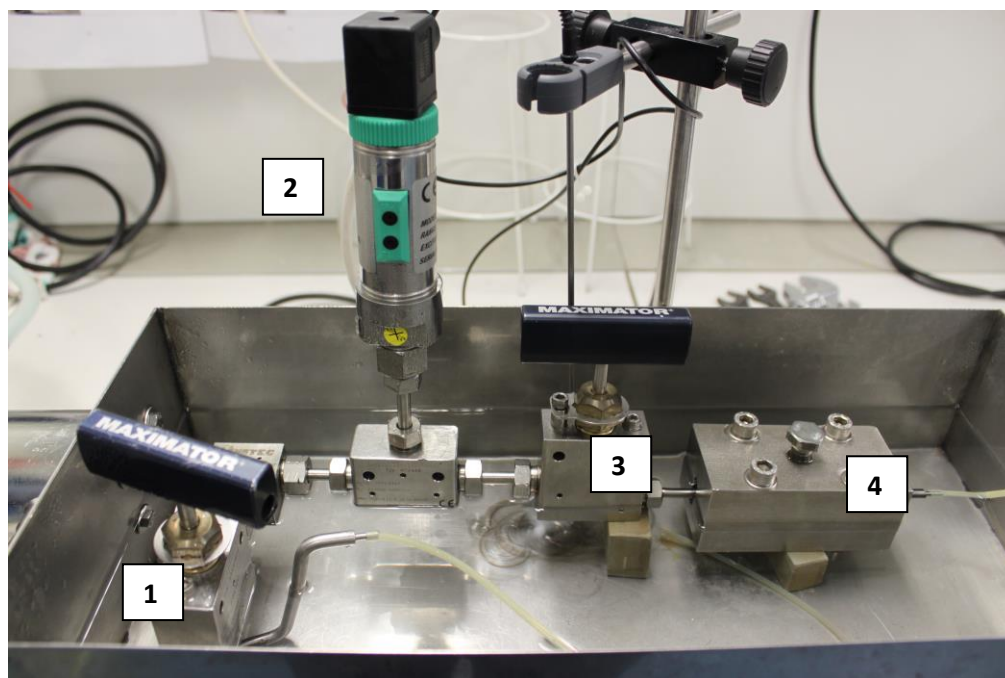


Abb. 3-3: Mikrokanalanlage zur Herstellung von SLN. Nach Einsaugen der Präemulsion durch das Öffnen des Einlassventils (1) wurde ein Druck von 1250 bar angelegt, welcher mittels elektronischem Druckmesser (2) gemessen wurde. Nach Öffnen des Auslassventils (3) erfolgte die Homogenisierung der Präemulsion durch das Mikrosystem (4), bestehend aus einer Edelstahl-doppelblende mit einer Weite von je 80 µm. Foto: S. Pretor, Aufbau nach Finke et al. 2012.

Tabelle 3-5: Zur Beladung und Markierung der SLN eingesetzte Stoffe

Stoff	Einwaage pro 15 g Formulierung [mg]	Anteil an 750 mg Lipidmatrix in Formulierung [% (m/m)]	Funktion
Coumarin 6	0,185	0,025	SLN- Markierung/Modellarzneistoff
DiI	0,750	0,1	SLN-Markierung
RhB	0,370	0,05	Modellarzneistoff
F-DHPE	7,5	1	SLN-Markierung
NDB-DHPE	7,5	1	SLN-Markierung

Um die innere lipophile Phase, d.h. die SLN von der äußeren wässrigen Phase der mit Coumarin 6-beladenen SLN-Dispersionen zu trennen, wurden 2 mL Dispersion in ein Vivaspin[®]-Röhrchen mit einem Molecular Weight Cutoff von 300000 Da (Sartorius, D-Göttingen) gefüllt und in einer Allegra 64 R-Zentrifuge (Beckman Coulter, D-Krefeld) für 15 Minuten bei 10000facher Erdbeschleunigung zentrifugiert.

3.2.1.2 Lipidnanoemulsionen

Analog zu den SLN-Formulierungen erfolgte die Herstellung von Lipidnanoemulsionen, indem als Lipidphase Mittelkettige Triglyceride (Miglyol 812, Caesar und Loretz GmbH, D-Hilden) verwendet wurden. Präemulgierung, Hochdruckhomogenisation und Beladung mit Coumarin 6 erfolgten wie für SLN in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

3.2.1.3 Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurde eine Mischung von 0,75 g PL90G und 14,25 g Aqua bidest über Nacht mit 1000 U/min bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Hand-Homogenisierung erfolgte mittels LiposoFast[®]-System (Avestin, CA-Ottava) unter Verwendung von Polycarbonatmembranen mit 100 nm mittlerer Porenweite (GE Lifesciences, D-Freiburg). Hierzu wurden mittels Hamilton-Spritze (Hamilton, D-Hoechst) von jedem Ansatz 15 Aliquots von je 1 mL mit jeweils 21 Zyklen manuell durch die Membranen gedrückt. Die Beladung mit Coumarin 6 erfolgte passiv, indem zu 988 µL Liposomendispersion 12,5 µL einer 0,1 %igen (m/V) Coumarin 6 Lösung in DMSO gegeben wurden. Die Umverteilung des Coumarin 6 in die Liposomen wurde durch einminütiges Vortexen (IKA MS 3 Basic, IKA, D-Staufen) der Mischung erreicht.

3.2.1.4 Mizellare Lösungen und Coumarin 6 Mikrokristalle

Die Herstellung 1 %iger (m/m) mizellarer Lösungen erfolgte durch Lösen von 1 g HS15 in 99 g Aqua bidest unter gleichzeitigem Rühren und leichtem Erwärmen auf ca. 30 °C. Schrittweise Zugabe von festem Coumarin 6 resultierte in der Solubilisation des Farbstoffes mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/100 mL.

Die Herstellung von Coumarin 6 Mikrokristallen erfolgte mittels Präzipitation, indem 12,5 µL der in Abschnitt 3.2.1.3 genannten Coumarin 6 Lösung zu 988 µL Krebs-Ringer-Puffer (KRB) pipettiert wurden. Auch hier wurde durch einminütiges Vortexen (s. Abschnitt 3.2.1.3) eine homogene Verteilung der auspräzipitierten Kristalle sichergestellt.

3.2.2 Charakterisierung kolloidaler Arzneistoffträger und Mikrokristalle

3.2.2.1 Partikelgrößenbestimmung

Die Partikelgröße und das Zetapotential aller hergestellten kolloidalen Arzneistoffträger wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Laser-Doppler-Anemometrie in einem ZetaSizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, D-Herrenberg) und entsprechenden Zeta-Potential Küvetten bestimmt. SLN und Nanoemulsionen wurden hierzu 1:100, Liposomendispersionen hingegen 1:50 mit partikelfreiem Millipore® Wasser verdünnt, während die mizellaren Lösungen unverdünnt vermessen wurden. Die Größenbestimmung der Coumarin 6 Mikrokristalle aus Abschnitt 3.2.1.4 erfolgte mittels inversem Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50 (Olympus, D-Hamburg), indem Bereiche, welche ca. 100 Partikel enthielten, fotografiert wurden. Die Größenabschätzung erfolgte anhand des eingefügten Messbalkens.

3.2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden SLN 1:100 und Liposomendispersionen 1:20 mit Aqua bidest verdünnt. Nach Auftragen der einzelnen Proben auf Kupfergitter (Plano, D-Wetzlar) und kurzem Antrocknen erfolgte die Negativ-Kontrastierung mittels Auftragen einer wässrigen Uranylacetat-Lösung 2 % (m/m). Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung der Formulierungen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss Leo (Zeiss, D-Jena) bei 200 kV und zusätzlich im Zeiss EM910 (Zeiss, D-Jena) bei 80 kV.

3.2.2.3 Stabilität in Gegenwart von Elektrolyten

Um die Stabilität der untersuchten SLN und Liposomen in Gegenwart von Elektrolyten zu untersuchen, wurden diese 1:100 mit unterschiedlichen Verdünnungen einer phosphatgepufferten Elektrolytlösung (PBS), welche einem Osmolaritätsbereich von 0-300 mOsmol/L entsprachen, verdünnt und mittels DLS wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben vermessen. Gemessen wurde hierbei neben Partikelgröße und Zeta-Potential auch die Leitfähigkeit der Elektrolytlösungen.

3.2.3 Oberflächenmodifizierung fester Lipidnanopartikel

3.2.3.1 Einbringen und Nachweis reaktionsfähiger Aminogruppen

Das Einbringen reaktionsfähiger funktioneller Gruppen in SLN erfolgte durch Austausch von Lecithin gegen DHPE, welches gemeinsam mit den anderen Komponenten der Lipidmatrix bei 90 °C aufgeschmolzen wurde. Der Anteil an DHPE betrug in den einzelnen Formulierungen zwischen 0 und 10 % (m/m). Die weiteren Herstellungsschritte erfolgten wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben.

Der anschließende Nachweis der funktionellen Gruppen auf der SLN-Oberfläche erfolgte mittels kovalenter Verbindung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DyLight 488[®] (Thermo Scientific, USA-Rockford), welcher über eine N-Hydroxysuccinimid (NHS) Estergruppe mit primären Aminogruppen reagiert. Nachdem SLN Dispersionen jeweils mit und ohne eingearbeitetes DHPE 1:100 mit PBS verdünnt wurden um den für die Reaktion optimalen pH-Wert von 7,4 zu erreichen, wurden 100 µL jeder Verdünnung mit 7 µL der Farbstofflösung (10 mg DyLight 488[®] in 1 mL DMSO) versetzt, kurz gemischt und drei Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach anschließender 24-stündiger Dialyse gegen PBS (Membran-MWCO: 8000 Da, Spectrum Labs, NL-Breda) erfolgte die Vermessung der Fluoreszenzintensitäten mittels schwarzer 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc, DK-Roskilde) im Fluoreszenz-Multiplattenreader Tecan GENios (Tecan, D-Crailsheim), wobei die unbehandelten Verdünnungen mitvermessen wurden um Streulichteffekte zu berücksichtigen.

3.2.3.2 Änderung des Zeta-Potentials von SLN-Formulierungen durch Polyelektrolyte

Zu jeweils 990 μL der wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben hergestellten, mittels NBD-DHPE oder DiI fluoreszenzmarkierten SLN-Formulierungen wurden entweder 10 μL einer 100 μM Lösung des Polyelektrolyts Polyallylaminhydrochlorid (PAH, mittlere Molekülmasse: 160.000 g/mol, Polysciences GmbH, D-Eppelheim) oder Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC, 275.000 g/mol, Polysciences GmbH, D-Eppelheim) hinzugefügt, wobei als Kontrolle 10 μL demineralisiertes Wasser dienten. Des Weiteren erfolgte die Inkubation von 950 μL SLN DiI mit 50 μL einer Poly-D-Lysin-Lösung der Konzentration 2 mg/mL (PAA Laboratories, D-Cölbe). Die Mischung erfolgte mittels Vortex (vgl. Abschnitt 3.2.1.3). Nach 24-stündiger Inkubation, im Falle von Poly-D-Lysin darüber hinaus auch nach 2, 3, 4 und 15 Tagen, erfolgte die Messung von mittlerer Partikelgröße und Zeta-Potential (vgl. Abschnitt 3.2.2.1).

3.2.4 Osmolaritätsbestimmung

Die Messung der Osmolarität der Dispersionen und ihrer Verdünnungen erfolgte jeweils als Dreifachbestimmung mit einem Halbmikro-Gefrierpunktosmometer Knauer K7000 (Knauer GmbH, D-Berlin), welches mit einer selbst hergestellten Natriumchloridlösung 400 mOsmol und Aqua bidest kalibriert wurde.

3.2.5 Zellkultivierung in Mikroflussskanälen

3.2.5.1 Vorbereitung der Mikroflussskanäle für die Kultivierung von Säugerzellen

Zur Vorbereitung der Kanäle wurden zunächst Injektionskanülen (Braun, D-Melsungen) mit einer Kanülenweite von 24G und einem Außendurchmesser von 0,55 mm um ca. 20° von der Kanülenspitze weg gebogen (Abb. 3-4) und vorsichtig in die Ein- und Auslässe der Kanäle geschoben, so dass die Kanülenspitzen mit dem Ein- bzw. Auslass der Mikrosysteme abschlossen.

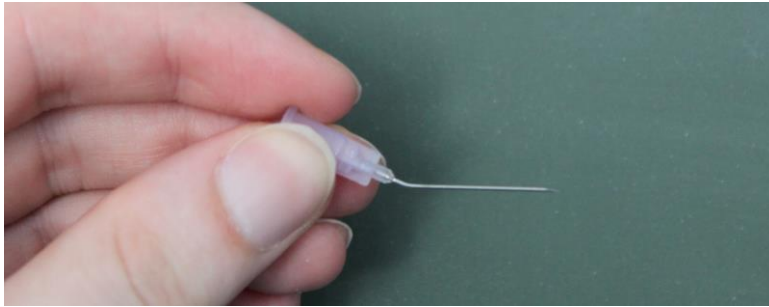


Abb. 3-4: Gebogene 24G-Kanüle zur Herstellung einer Ein- und Auslassverbindung mit den Mikrokanälen

Durch Aufbringen von Silikonkleber (RS Components GmbH, D-Mörfelden-Walldorf) zwischen Kanüle, Glas und PDMS erfolgte nach einer Aushärtezeit von ca. drei Stunden unter einem Laborabzug die Fixierung der Ein- und Auslasskanülen (Abb. 3-5).

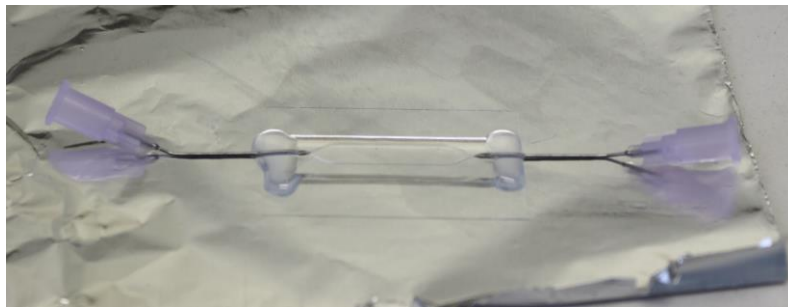


Abb. 3-5: Mikrokanal mit fixierten Ein- und Auslasskanülen nach dem Aushärten des Silikonklebers

Die Desinfektion erfolgte durch 30-minütige Inkubation mit Ethanol 70 % (V/V, Abb. 3-6). Nach Spülen der Kanäle mit salinischem Phosphatpuffer (PBS) unter aseptischen Bedingungen erfolgte eine zweistündige Inkubation mit Poly-D-Lysin-Lösung 0,02 mg/mL (PAA Laboratories, D-Cölbe) bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen der verbliebenen Beschichtungslösung erfolgte die Zelleinsaat.

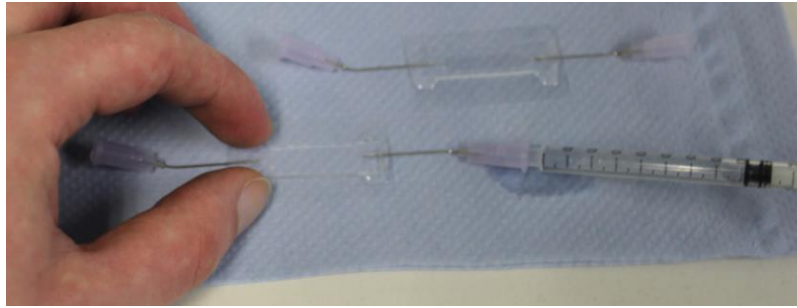


Abb. 3-6: Desinfektion eines Mikrokanals durch Einspritzen von Ethanol 70 % (V/V) und anschließender Inkubation

3.2.5.2 Zelleinsaat in Mikroflussskanäle

Zur Einsaat in die Mikroflussskanäle wurden die frisch passagierten Zellen durch Zentrifugieren von der Trypsin-Medium-Mischung getrennt. Zum Zellpellet wurde anschließend frisches Kultivierungsmedium hinzugefügt, dessen Menge so gewählt wurde, dass eine Zellkonzentration von 3 Mio. Zellen pro mL erreicht wurde. Nachdem nach kurzem, heftigem Vereinzeln diese Suspension mit einer 1 mL-Kunststoffspritze (Braun, D-Melsungen) aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abbewegen des Kolbens Reste von Luftblasen entfernt wurden, erfolgte die Zelleinsaat durch vorsichtiges Einspritzen von jeweils ca. 0,1 mL Zellsuspension in jeden Kanal (Abb. 3-7).



Abb. 3-7: Zelleinsaat in Mikrokanal. Durch leichtes Neigen des Kanals in angehobener Position ließ sich die Befüllung mit der Zellsuspension genau beobachten.

Dies entsprach bei einem Kanalvolumen von 15 μL einer Zelldichte von 45.000 Zellen pro cm^2 Kanalboden. Anschließend wurde überschüssige Zellsuspension aus den Kanüleneinlässen entfernt und durch ca. 0,1 mL Zellkulturmedium pro Einlass ersetzt. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Kanüleneinlässe vorsichtig mit Luer-Lock[®]-Adaptern

(Roth, D-Karlsruhe) verschlossen und die Kanäle zum Anwachsen der Zellen für 16 Stunden in einem Zellkultur-Inkubator gelagert (Abb. 3-8).

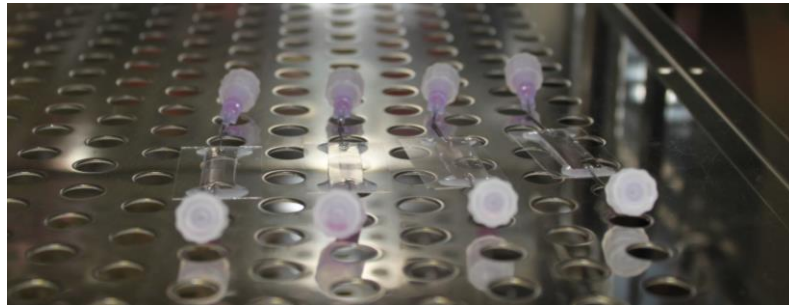


Abb. 3-8: Mikrokanäle nach der Zelleinsaat im Zellkulturinkubator. Zum Schutz vor Verdunstung des Mediums wurden die Kanüleneinlässe (violett) mit Luer-Lock®-Adaptern verschlossen.

3.2.5.3 Zelleinsaat auf Mikrotiterplatten mit Glasboden

Für Versuche unter statischen Bedingungen wurden sterile 24-Well-Mikrotiterplatten mit dünnem Glasboden (PAA Laboratories, D-Cölbe) wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben mit Poly-D-Lysin beschichtet. Nach Absaugen der verbliebenen Beschichtungslösung erfolgte die Einsaat der Zellen mit einer Dichte von ebenfalls 45.000 pro cm².

3.2.6 Viabilitätsfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Zellschädigung durch Scherstress im Mikroflussskanal wurden jeweils vor und nach den Versuchen die Zellen für 15 Minuten mit jeweils 20 µg/mL der DNA-Farbstoffe Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, D-Steinheim) und Propidiumiodid (PromoCell, D-Heidelberg) in KRB inkubiert. Nach einem Waschschriff mit KRB erfolgte die Untersuchung der Proben mittels Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50 (s. Abschnitt 3.2.2.1) vor und nach Durchführung von Flussexperimenten. Durch Bestimmung der Anzahl an Zellkernen an gleicher Stelle wurde zunächst der prozentuale Anteil abgelöster Zellen ermittelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl zu Beginn und am Ende des Versuchs mittels folgender Gleichungen:

$$\text{Zellen}_{\text{tot vor Versuch}} = \frac{\text{Anzahl rot fluoreszierender Zellkerne vor Versuch}}{\text{Anzahl blau fluoreszierender Zellkerne vor Versuch}} \times 100 \quad \text{Gl. 3-5}$$

und

$$\text{Zellen}_{\text{tot nach Versuch}} = \frac{\text{Anzahl rot fluoreszierender Zellkerne nach Versuch}}{\text{Anzahl blau fluoreszierender Zellkerne nach Versuch}} \times 100 \quad \text{Gl. 3-6}$$

Zum Vergleich der Zellviabilitäten auf Mikrotiterplatten und in Mikroflusskanälen wurde der Mischung aus Hoechst 33342 und Propidiumiodid der Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM (PromoCell, D-Heidelberg) in 5 µM Konzentration hinzugefügt. Nach Waschen mit KRB wurde ebenfalls eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Als Positivkontrolle auf eine erfolgte Zellmembranschädigung diente eine einstündige Inkubation der Zellen in Mikroflusskanälen und Mikrotiterplatten mit einer 0,5 mM Lösung des Apoptoseinduktors Staurosporin (Sigma Aldrich, D-Steinheim) in KRB.

3.2.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Alle Untersuchungen mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurden am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der TU Braunschweig durchgeführt. Hierbei kam ein Nikon A1R Mikroskopsystem (Nikon, D-Düsseldorf) zum Einsatz. Es bestand im Einzelnen aus einer motorisierten Mikroskopeinheit, einer Kamera mit PC-Anschluss für die Auswertung der Daten mittels NIS-Elements-Software, einem Lasergenerator und einer beheizbaren Inkubationskammer (OkoLab, I-Neapel).

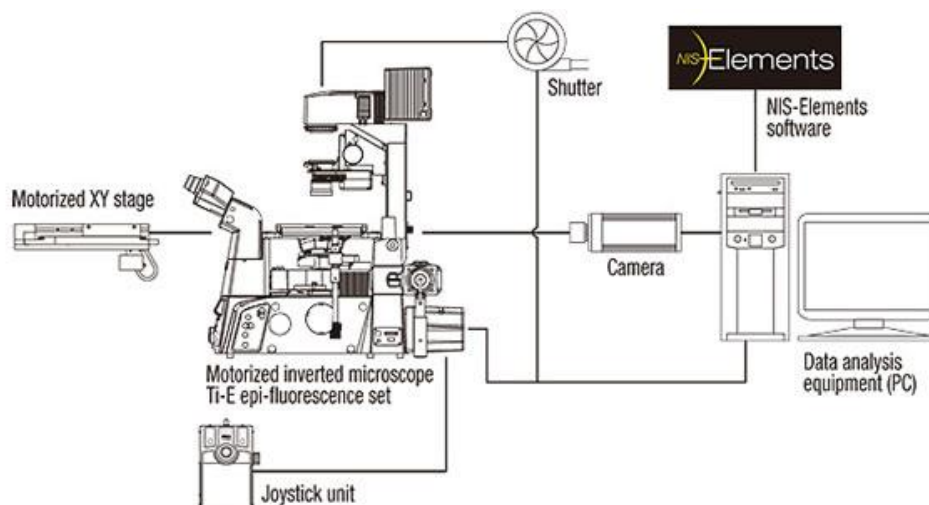


Abb. 3-9: Schematische Darstellung eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskopsystems (Quelle: www.nikon.com)

3.2.7.1 Untersuchung der Aufnahme von SLN durch Epithel- und Endothelzellen unter statischen und unter Flussbedingungen

Wie in Abschnitt 3.2.5.3 dargestellt wurden die Zellen auf Mikrotiterplatten mit dünnem Glasboden ausgesät und über Nacht auf der beschichteten Glasoberfläche anwachsen gelassen. Nach Austausch des jeweiligen Kultivierungsmediums durch eine Mischung aus SLN und Medium 1:50 wurde zwischen 10 und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte eine 15 minütige Inkubation mit Hoechst 33342 20 µg/mL in PBS. Nach einem abschließenden Waschschrift erfolgte die konfokalmikroskopische Betrachtung unter Verwendung eines 60fach Ölimmersionsobjektives, auf das ein Tropfen Immersionsöl aufgebracht wurde, welches eine benetzende Schicht zwischen Objektiv und Mikrotiterplattenboden herstellte. Die Betrachtung der Zellen erfolgte sowohl im Durchlicht- als auch im Fluoreszenzmodus unter Anregung des Hoechst-Farbstoffes bei 405 nm und des Coumarin 6 bei 488 nm. Die Emissionswellenlängenbereiche betrugen für Hoechst 33342 425-475 nm und für Coumarin 6 500-550 nm. Durch Variation von Pinholegröße und Laserintensität konnte für jede Aufnahme eine optimale Auflösung erzielt werden. Zusätzlich zu 2D-Aufnahmen wurden z-stack-Aufnahmen durchgeführt um die Verteilung der Coumarin 6 Fluoreszenz im Zellinneren zu überprüfen.

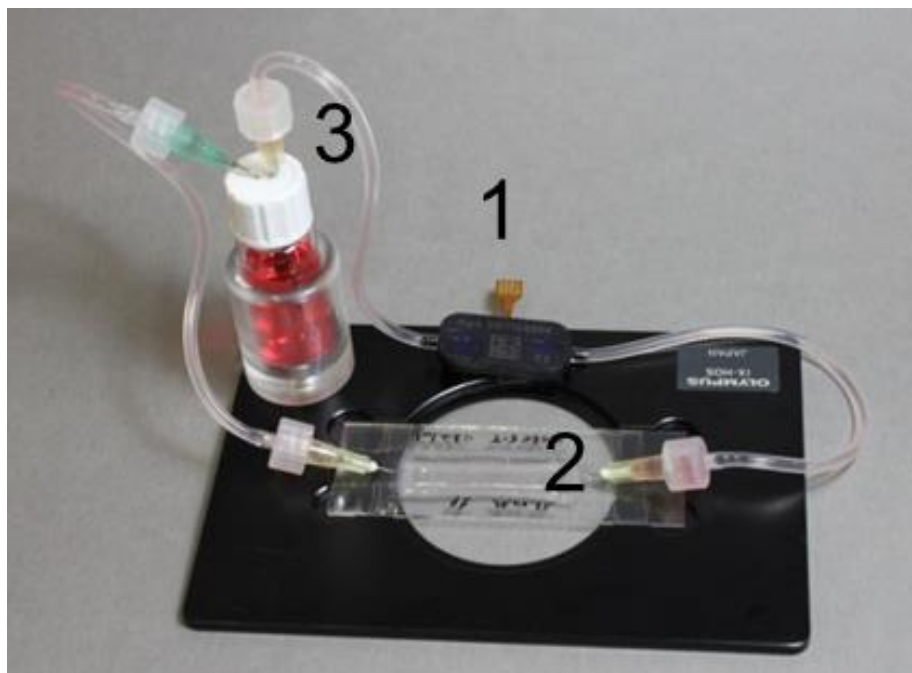


Abb. 3-10: Flusssystem zur Untersuchung der zellulären Coumarin 6-Aufnahme unter Flussbedingungen, bestehend aus Piezopumpe (1), Mikroflussskanal (2) und Mediumreservoir

Zur Untersuchung der Coumarin 6-Aufnahme aus kolloidalen Formulierungen unter Flussbedingungen wurde jeweils ein auf Deckgläschen gebondeter Flusskanal nach erfolgreicher Zelladhäsion auf einem Objektträgerhalter (Olympus, D-Hamburg) fixiert und über Silikonschläuche (Helix Medical, D-Kaiserslautern) und Luer-Lock-Adapter (Roth, D-Karlsruhe) mit einem 2 mL fassenden Mediumreservoir und einer Piezo-Pumpe (mp-6, Bartels Mikrotechnik, D-Dortmund) verbunden (Abb. 3-10). Die Pumpensteuerung erfolgte über die Einstellung von Amplitude und Frequenz, wobei die zugehörigen Flussraten mit demineralisiertem Wasser im gleichen Flusssystem kalibriert wurden. Das Flusssystem wurde nach Autoklavierung aller Medium berührenden Komponenten unter einer Sterilwerkbank zusammengesetzt und das Mediumreservoir mit einer Mischung aus Kultivierungsmedium für HCE-T-Zellen und Coumarin 6-beladenen SLN (SLN-C) entsprechend einer Konzentration von 1000 µg Lipidmatrix pro mL befüllt. Anschließend erfolgten die luftblasenfreie Kopplung der Schläuche und die Unterbringung im Zellkulturinkubator. Die Mischung wurde für 15 Minuten mit einer Flussrate von 0,5 mL/min durch das System gepumpt. Nach Entkoppeln des Kanals, Waschen der Zellen durch manuelle Injektion von PBS (ca. 1 mL/min) und Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 (s. oben) erfolgte die Betrachtung der Zellen unter dem CLSM (s. oben).

3.2.7.2 Live Cell Imaging unter statischen und unter Flussbedingungen

Zur Vorbereitung des Live Cell Imaging wurden die betrachteten Zellen wie in den Abschnitten 3.2.5.2 und 3.2.5.3 dargestellt in Mikroflusskanäle und Mikrotiterplatten eingesät. Nach erfolgter Anheftung der Zellen an die beschichtete Glasoberfläche erfolgte die Färbung der Zellkerne mit einer Mischung aus Hoechst 33342 und Propidiumiodid (s. Abschnitt 3.2.6). Anschließend wurde jedes Well mit 250 µL KRB befüllt, sodass die Zellen komplett mit Pufferlösung bedeckt waren.

Für die Untersuchungen unter statischen Bedingungen wurden die Mikrotiterplatten in die dafür vorgesehene Halterung auf dem Mikroskoptisch des CLSM eingesetzt.

Für die Positionierung der Flusskanäle wurde ein spezieller Einsatz mit einer dünnen Schicht Fixierharz bestrichen und auf diese Schicht wurde der zu untersuchende Mikroflusskanal unter leichtem Andrücken fixiert. Eventuelle Passungenauigkeiten wurden durch leichtes Biegen der Zu- und Ablaufkanüle ausgeglichen. Ein kontinuierlicher Mediumzustrom wurde über eine Spritzenpumpe (Chemyx, USA-Stafford), auf der eine 20 mL Spritze (Braun, D-

Melungen) eingespannt war, erreicht. Die Spritze wurde über Luer-Lock[®]-Adapter und Silikonschlauch (Helix Medical, D-Kaiserslautern) mit einem Ventilsystem (Warner, USA-Hamden) und den Mediumreservoirs verbunden. Zunächst erfolgte die Verbindung der Spritze mit dem Kanal. Anschließend wurde durch Öffnen des Ventils zum Pufferreservoir die noch freie Kanülenverbindung des Kanals vollständig mit Flüssigkeit befüllt um das Einschließen von Luftblasen durch die Verbindung mit der Reservoirseite zu vermeiden. Die Inkubationskammer des Mikroskopsystems (s. Abschnitt 3.2.7) wurde während der gesamten Versuche auf 37 °C temperiert. Im Anschluss an die Positionierung von Mikrotiterplatten oder Mikroflusskanälen erfolgte die Fokussierung des 20fachen Objektivs auf Gruppen von mehr als 10 miteinander verbundenen Zellen, zwischen denen auch unbewachsene Bereiche lagen. Die Färbung der Zellkerne diente hierbei der reproduzierbaren Einstellung der vertikalen Position des Objektivs, indem auf die Position mit der größten Ausdehnung der Zellkerne fokussiert wurde (s. Schema Abb. 3-11).

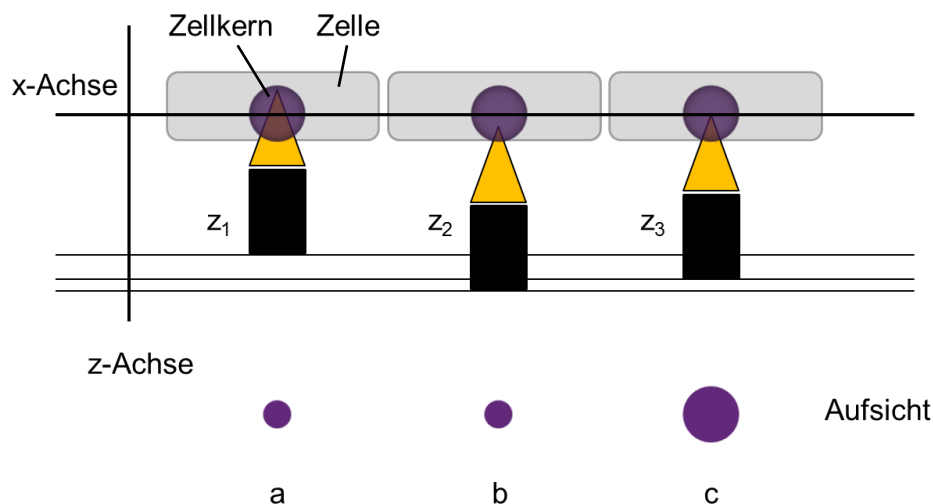


Abb. 3-11: Fokussierung des CLSM-Objektivs für reproduzierbare Fluoreszenzintensitäten. In den Positionen z_1 und z_2 befindet sich der Fokus des Objektivs am oberen bzw. unteren Rand des Zellkerns, was ihn im mikroskopischen Bild klein erscheinen lässt (a, b). Seine größte Flächenausdehnung erreicht der Zellkern, wenn das Objektiv seinen Fokus auf das Kernzentrum richtet (Position z_3 , c).

Unter statischen Bedingungen wurden zu den Zellen jeder betrachteten Kavität 250 μL einer 1:25 Verdünnung von mit Coumarin 6 beladenen SLN, Liposomen oder Coumarin 6 Mikrokristallen mit KRB pipettiert, was zunächst einem Lipidmatrixanteil von 2000 $\mu\text{g/mL}$ entsprach, der durch das bereits vorhandene Medium in der Kavität auf 1000 $\mu\text{g/mL}$ verdünnt

wurde. Um die optischen Einstellungen nicht zu stören wurde ein Berühren der Mikrotiterplatte während der Probenzugabe vermieden.

Zur Vorbereitung des Live Cell Imaging unter Flussbedingungen wurde jeder einzelne Mikroflusskanal auf einem Rahmen fixiert (Abb. 3-12). Um den Einschluss von Luft ins System zu vermeiden, wurden vor dem Zusammenbau des Flusssystems (Abb. 3-13) alle Schläuche und Kanülen der Kanäle mit KRB gefüllt. Unter Flussbedingungen wurde die gewünschte Flussrate an der Spritzenpumpe eingestellt und die Zellen zunächst mit KRB umspült. Durch Umschalten auf das Formulierungsreservoir erfolgte die Umspülung mit einer 1:50 Verdünnung entweder von mit Coumarin 6-beladenen SLN, Liposomen oder Coumarin 6 Mikrokristallen, welche durch erneutes Umschalten auf KRB wieder aus dem Kanal entfernt werden konnten.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten im betrachteten Bereich erfolgte durch Aufnahme einer Bildfolge alle vier Sekunden. Die resultierende Filmsequenz wurde im Anschluss an die Versuche ausgewertet, indem stets sechs Zellen und sechs getrennte Bereiche außerhalb der Zellen ausgewählt und markiert wurden. Auf Basis der Intensitätsdaten wurde für jeden der Bereiche die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen und jeweils für die Bereiche innerhalb und außerhalb der Zellen gemittelt.

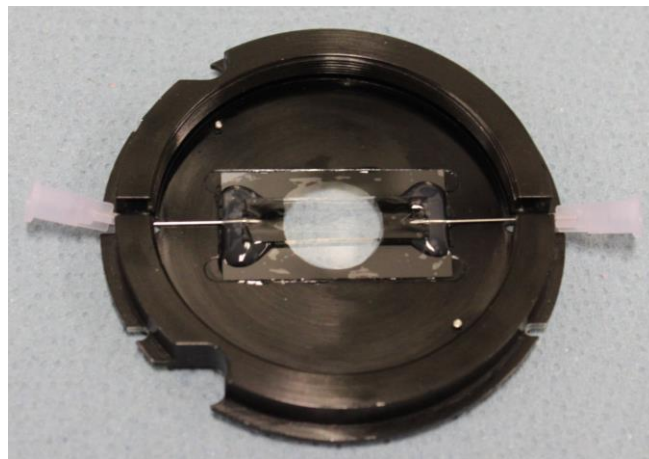


Abb. 3-12: Auf Objekttrichter-Rahmen fixierter Mikroflusskanal mit HCE-T Zellen kurz vor dem Einbau ins CLSM

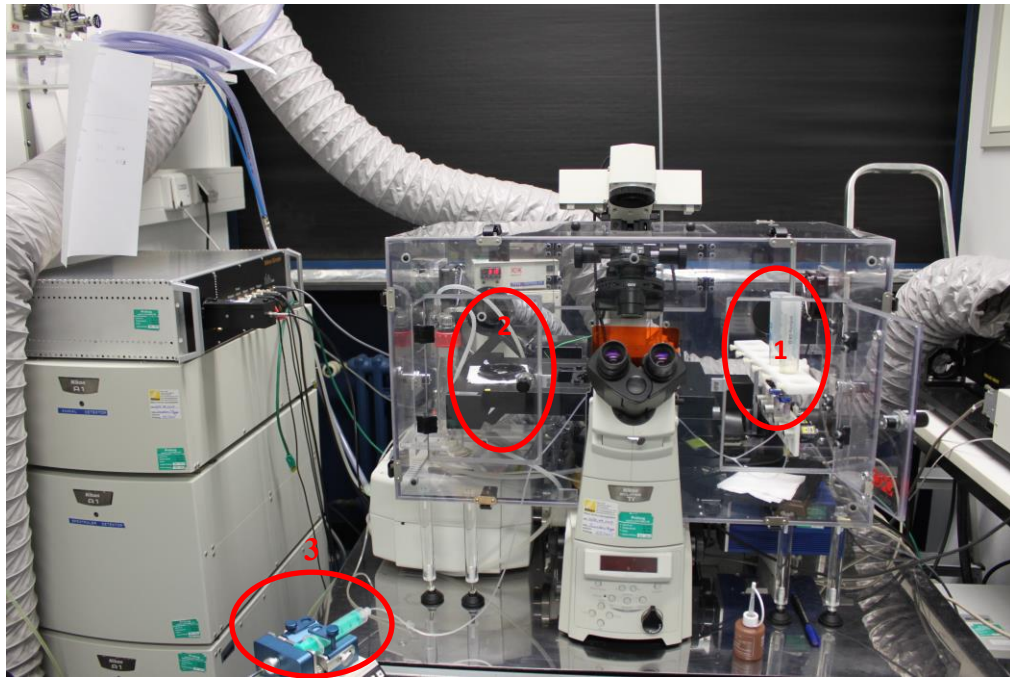


Abb. 3-13: CLSM mit Mikroflusssystem bestehend aus Mediumreservoiren und Ventilsystem (1), Mikroflusskanal, noch nicht eingebaut (2), und Spritzenpumpe (3).

3.2.8 Fluorimetrie

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme von Coumarin 6 in Epithelzellen wurde die Fluorimetrie herangezogen, um die mittels Live cell imaging erhaltenen Resultate zu prüfen und einen längeren Untersuchungszeitraum mit einer genügend großen Stichprobenzahl zu erschließen. Hierzu wurden in 6 x 10 Wells einer schwarzen, herstellerseitig beschichteten 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc, DK-Roskilde) jeweils 50.000 HCE-T Zellen eingesät und am folgenden Tag mit KRB gewaschen. Im Falle von HaCaT Zellen wurden pro Well 10000 Zellen eingesät und diese für 3 Tage in DMEM kultiviert. Die zu untersuchenden SLN-, Liposomen- und Coumarin 6 Mikrokristallformulierungen wurden mit KRB 1:50 verdünnt und jeweils 100 μ L mit einer elektronischen 8-Kanal-Multifunktionspipette (Eppendorf, D-Hamburg) zu jedem Well pipettiert. Anschließend erfolgte die Lagerung der Platte bei 37 °C im Zellkulturinkubator (s. Abschnitt 3.1.5). Nach 5, 10, 15 und 30 Minuten erfolgte das Absaugen der untersuchten Formulierung mit anschließendem Waschen mit KRB. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels Fluoreszenz-Multiplattenreader (s. Abschnitt 3.2.3.1) unter Verwendung einer schwarzen Auflageplatte zur Vermeidung von Streulichteffekten. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlänge 535 nm.

Als Maß für die Coumarin 6 Aufnahme wurde die relative Änderung der Fluoreszenzintensität (RFI) im Vergleich zu ausschließlich mit KRB inkubierten Zellen herangezogen, welche nach Gl. 3-7 berechnet wurde:

$$\text{RFI [\%]} = \frac{\text{Fluoreszenzintensität Probe} - \text{mittlere Fluoreszenzintensität Zellen mit KRB}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität Zellen mit KRB}} \times 100 \quad \text{Gl. 3-7}$$

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von SLN durch Epithelzellen

Eine potentielle aktive Aufnahme von SLN durch die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde fluoreszenzmikroskopisch exemplarisch an A549, CaLu-3 und HCE-T Zellen untersucht. Hierzu wurden jeweils 10000 A549 und jeweils 20000 CaLu-3 und HCE-T Zellen pro Well einer 24-Well Mikrotiterplatte (TPP, CH-Trasadingen) eingesät und für 48 Stunden im jeweiligen Medium (s. Abschnitt 3.1.4) kultiviert. Im Anschluss erfolgte für zwei Stunden die Inkubation mit 1:50-Verdünnungen DiI beladener SLN-Dispersionen, welche entweder unbehandelt oder mit den Polyelektrolyten Poly-D-Lysin, PAH bzw. PDADMAC modifiziert waren. Schließlich erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS die Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und die fluoreszenzmikroskopische Analyse wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben.

3.2.10 Toxizitätstests

3.2.10.1 Resazurin-Assay

Die Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Formulierungen erfolgte indirekt über die Messung der Zellviabilität mittels CellTiter Blue®-Assay (Promega, USA-Madison) nach Anleitung des Herstellers. In eine schwarze, beschichtete 96-Well Mikrotiterplatte (s. Abschnitt 3.2.8) wurden pro Well 10000 HCE-T oder 5000 A549 bzw. MHEC5-T Zellen gesät. Im Falle der HCE-T betrug die Wachstumszeit in der Platte 48 Stunden, im Falle der anderen Zelllinien 24 Stunden. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von SLN-Dispersionen, welche am Fraunhofer ITEM, Fachbereich Experimentelle Immunologie mittels einer 137-Cäsiumquelle und einer Strahlendosis von 150 Gy sterilisiert wurden

(Gammacell 2000 Mølsgaard Medical, Heorsholm, Dänemark). Anschließend erfolgte die Verdünnung mit den jeweiligen Kultivierungsmedien. Der Anteil an Lipidmatrix variierte zwischen 100 und 2500 µg/mL und die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Als Kontrollen dienten Zellkulturmedium (Negativkontrolle, Fluoreszenzintensität entspricht 100 % Zellviabilität) und eine 0,015 %ige Lösung von Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma Aldrich, D-Steinheim, Positivkontrolle, Fluoreszenzintensität entspricht 0 % Zellviabilität) in Zellkulturmedium. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die 20-stündige Inkubation mit einer 1+5-Verdünnung von Assayreagenz und Kultivierungsmedium der jeweiligen Zellart. Nach der Vermessung im Fluoreszenz-Multiplattenreader (s. Abschnitt 3.2.3.1, Anregungswellenlänge: 535 nm, Emmissionswellenlänge: 590 nm) erfolgte die Auswertung nach Gl. 3-8:

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{Intensität Probe} - \text{Intensität Positivkontrolle}}{\text{Intensität Negativkontrolle} - \text{Intensität Positivkontrolle}} \times 100 \quad \text{Gl. 3-8}$$

Zur Abschätzung der SLN-Toxizität im Hinblick auf die Versuchsdauer der Live cell imaging Experimente wurde die Inkubationszeit der Formulierungen im Falle der HCE-T Zellen auf eine Stunde gesenkt und die Zellzahl auf 40000 pro Well erhöht, um die Inkubationszeit des Assayreagenzes auf vier Stunden senken zu können.

3.2.10.2 Fluoreszenzfärbung

Da der Resazurin-Assay eher eine Aussage zur Stoffwechselaktivität von Zellen als zur tatsächlichen Zellschädigung trifft, wurde er um eine Fluoreszenzfärbung der Zellen mit einer Mischung aus 5 µM Calcein AM und 15 µM Propidiumiodid in PBS ergänzt. Zelleinsaat und –Inkubation erfolgten analog zu Abschnitt 3.2.6, mit der Ausnahme der Einsaat in eine transparente 96-Well Mikrotiterplatte aus Polystyrol (TPP, CH-Trasadingen). Nach Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit der Färbemischung für 15 Minuten und die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung.

3.2.11 Statistik

Die statistische Analyse der Messergebnisse erfolgte mittels IBM SPSS, Version 22 (IBM, D-Ehingen) unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Tukey's Post-Hoc-Test. Eine vorhergehende Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α betrug in allen Fällen 0,05. Die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erfolgte auf dieser Basis wie folgt: * Unterschied signifikant mit $\alpha < 0,05$, ** Unterschied hochsignifikant mit $\alpha < 0,01$ und *** Unterschied sehr hoch signifikant mit $\alpha < 0,001$.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der eingesetzten Formulierungen

4.1.1 Partikelgrößenanalyse und Zeta-Potential-Messung

Die Partikelgrößenmessung mittels PCS ergab für alle nanopartikulären Formulierungen einen mittleren Partikeldurchmesser (z-average) von weniger als 150 nm. Verglichen mit unbeladenen SLN erschienen SLN-C geringfügig größer (Abb. 4-1). Die Beladung mit DiI und Rhodamin B hatte ebenso wenig Einfluss auf den mittleren Partikeldurchmesser der SLN. Mit einem Polydispersitätsindex (Pdl) von unter 0,2 besaßen diese SLN-Formulierungen eine monomodale Partikelgrößenverteilung.

Eine deutliche Verkleinerung des mittleren Partikeldurchmessers auf weniger als 100 nm war hingegen bei den SLN-Formulierungen, besonders bei SLN-DHPE zu beobachten, wenn ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Phospholipid zur Herstellung eingesetzt wurde. Mit einem Pdl von 0,4 war die Partikelgrößenverteilung dieser Formulierung nicht mehr monomodal. Im Falle von SLN-NBD fielen im Vergleich zu den mit Coumarin 6 beladenen SLN der mittlere Partikeldurchmesser mit 100 nm etwas kleiner und der Pdl mit 0,22 höher aus. Abb. 4-2 zeigt die Zeta-Potentiale der SLN-Formulierungen, welche alle schwach negativ waren und für die farbstoffbeladenen SLN im Bereich von -10 bis -15 mV lagen. Im Falle von SLN-DHPE und SLN-NBD war das Zeta-Potential mit -30 mV beträchtlich niedriger.

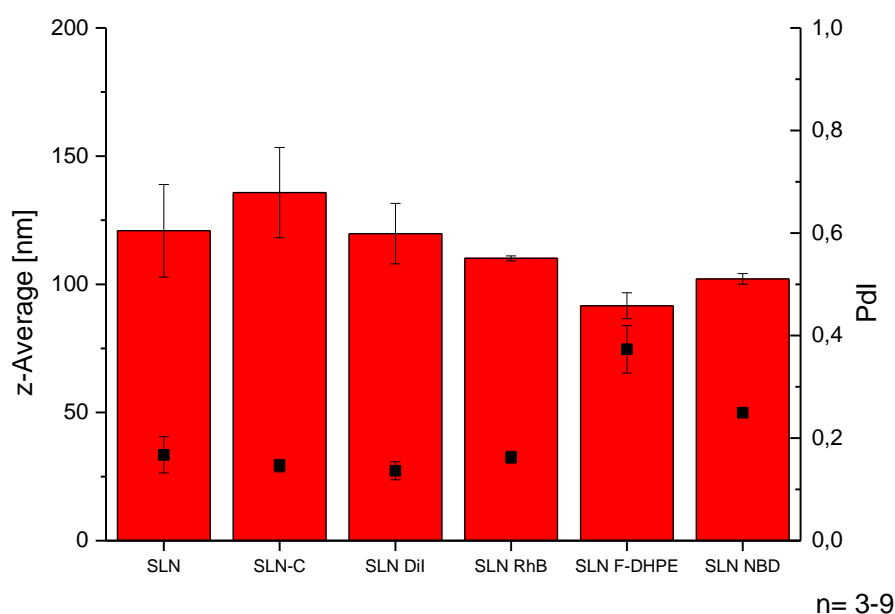


Abb. 4-1: Partikelgrößen der mittels Hochdruckhomogenisation im Mikrokanalsystem hergestellten SLN-Formulierungen. Die Partikel waren unbeladen (SLN), mit 0,025 % (m/m) Coumarin 6 (SLN-C), 0,1 % (m/m) DiI (SLN DiI) oder 0,05 % (m/m) Rhodamin B (SLN RhB) beladen, sowie mit zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Phospholipiden markiert (SLN F-DHPE und SLN NBD, jeweils 1 % Farbstoffanteil (m/m) in der Lipidmatrix). Die Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers erfolgte mittels PCS nach Verdünnung 1:100 in Millipore®-Wasser.

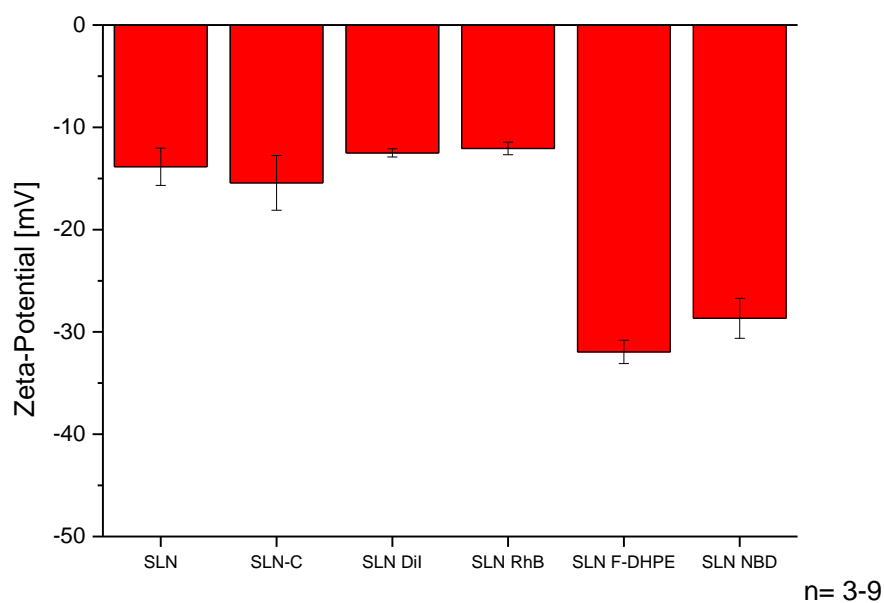


Abb. 4-2: Zeta-Potential der SLN-Dispersionen gemessen nach 1:100-Verdünnung in Millipore®-Wasser.

Verglichen mit den SLN-Formulierungen wiesen die Liposomen die gleichen Partikelgrößen auf, mit der gleichen Tendenz zum leichten Größenwachstum nach Beladung mit Coumarin 6 (Abb. 4-3). Der PDI fiel mit Werten um 0,1 deutlich geringer aus, was auf eine enge, monomodale Partikelgrößenverteilung schließen lässt.

Die mizellaren Lösungen wiesen mit 15 nm einen formulierungstypischen Durchmesser auf und besaßen mit einem PDI um 0,1 ebenfalls eine enge monomodale Partikelgrößenverteilung.

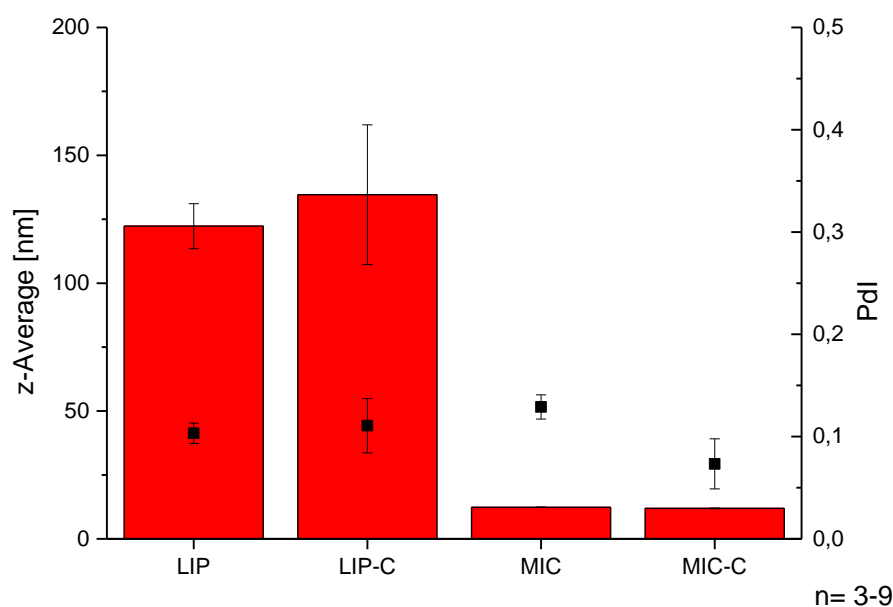


Abb. 4-3: Partikelgrößen der mit Coumarin 6 beladenen (LIP-C) und unbeladenen Liposomendispersionen (LIP) und mit Coumarin 6 beladenen (MIC-C) und unbeladenen mizellaren Lösungen (MIC). Die Bestimmung erfolgte mittels PCS nach Verdünnung 1:50 mit Millipore®-Wasser (LIP, LIP-C) bzw. unverdünnt (MIC, MIC-C).

Das Zeta-Potential der Liposomen lag mit -15 mV erwartungsgemäß im negativen Bereich (Abb. 4-4) und war dem der SLN-Formulierungen ähnlich. Die mizellaren Formulierungen wiesen ein sehr kleines, im positiven Bereich liegendes Zeta-Potential von unter 5 mV auf.

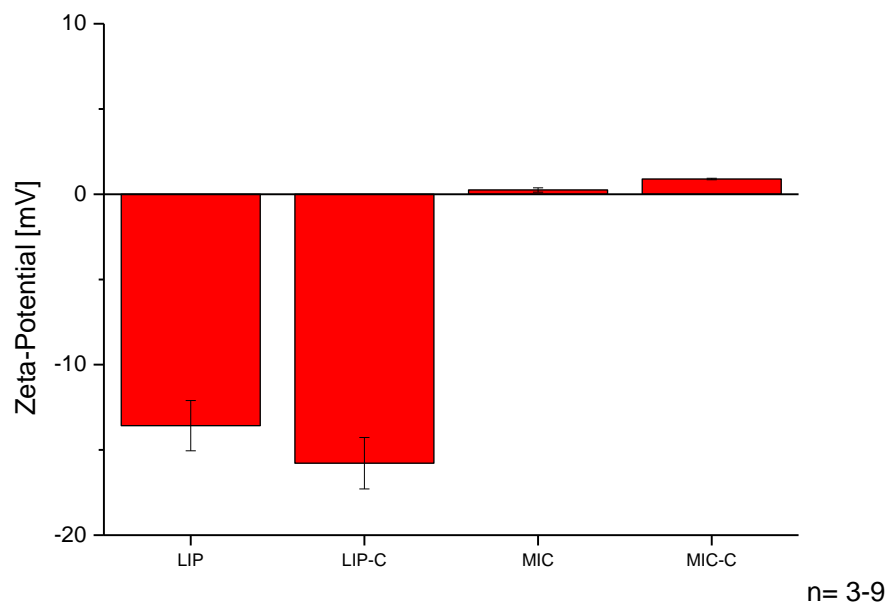


Abb. 4-4: Zeta-Potential der beladenen und unbeladenen liposomalen Dispersionen und mizellaren Lösungen, gemessen nach 1:50-Verdünnung in Millipore®-Wasser (LIP, LIP-C) bzw. unverdünnt (MIC, MIC-C).

Die Herstellung von SLN mit variierenden Coumarin 6 Anteilen ließ einen Trend zu wachsenden mittleren Partikeldurchmessern und einer breiteren Partikelgrößenverteilung mit steigendem Anteil an Coumarin 6 erkennen (Abb. 4-5). Bei der Verwendung von Mittelkettigen Triglyceriden als Lipidmatrix konnte unter den gleichen Herstellungsbedingungen wie für SLN die Bildung von Nanoemulsionen beobachtet werden, deren mittlerer Partikeldurchmesser im Falle unbeladener Teilchen bei rund 160 nm lag. Mit einem Pdl von unter 0,1 war eine schmale monomodale Partikelgrößenverteilung gegeben. Mit steigendem Anteil an Coumarin 6 zeigte sich auch hier eine, allerdings nicht regelmäßige, Partikelgrößenzunahme, sowie eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung. Das Zeta-Potential der Nanoemulsionen fiel im Vergleich zu den SLN deutlich stärker negativ aus und zeigte eine tendenziell geringere negative Ladung mit wachsendem Anteil an Coumarin 6 (Abb. 4-6).

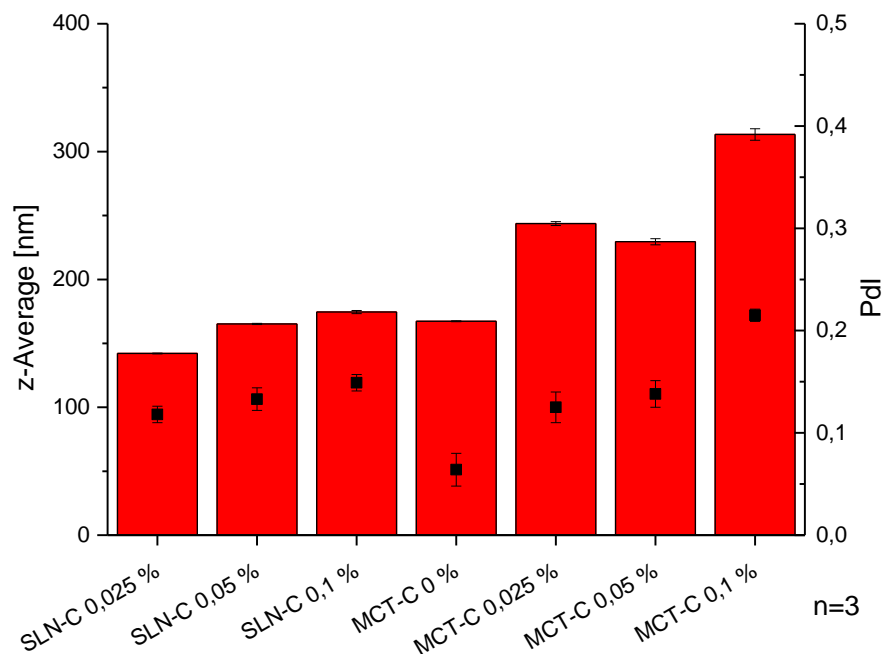


Abb. 4-5: Mittels PCS nach 1:100-Verdünnung in Millipore®-Wasser bestimmte mittlere Partikeldurchmesser und PDI von SLN und Nanoemulsionen auf Basis Mittelkettiger Triglyceride (MCT), welche mit unterschiedlichen Anteilen an Coumarin 6 beladen waren.

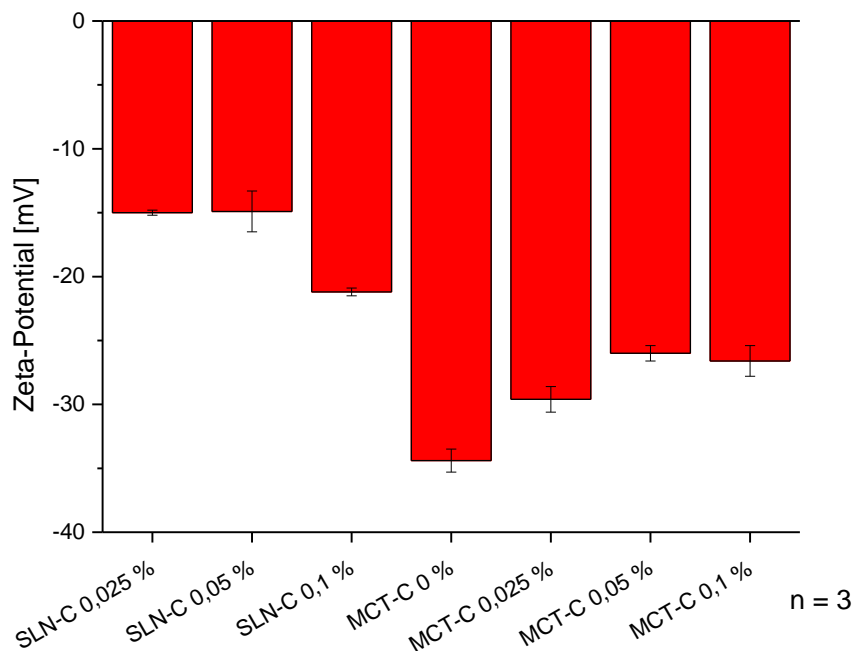


Abb. 4-6: Nach 1:100-Verdünnung in Millipore®-Wasser gemessene Zeta-Potentiale von SLN und Nanoemulsionen auf Basis Mittelkettiger Triglyceride (MCT), jeweils beladen mit unterschiedlichen Anteilen an Coumarin 6.

4.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie und Mikrokristallcharakterisierung

Zur Analyse der Form nanoskaliger Arzneistoffträger wurden die hergestellten Formulierungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nach Negativkontrastierung betrachtet. Hierbei war deutlich zu erkennen, dass die als weiße Körper erscheinenden SLN überwiegend keine kugel-, sondern eine plättchenförmige Gestalt aufwiesen (Abb. 4-7A, rotes Oval). Die Beladung mit Coumarin 6 änderte nichts an dieser Formgebung (Abb. 4-7B, rotes Oval). Aufgrund der anisometrischen Gestalt unterschieden sich die mikroskopisch bestimmten Partikelgrößen deutlich von den PCS-Ergebnissen. So betrug die längste Ausdehnung der stäbchenförmigen Partikel rund 500 nm. Bei den mehr rundlichen Partikeln entsprachen die Ausdehnungen in etwa den mittels PCS gemessenen Werten von 100 bis 200 nm. SLN NBD lagen ebenfalls als anisometrische Partikel vor, jedoch schien hier der Anteil rundlicher Partikel vergleichsweise höher zu sein (Anhang, Abb. 8-1). Liposomen zeigten eine kugelförmige Gestalt (Abb. 4-8 A), wobei durch die Kontrastierungsprozedur und den daraus folgenden Wasserentzug einige Vesikel deformiert erschienen (rot eingekreiste Bereiche). Auch bei den Liposomen wurde keine Formveränderung durch Beladung mit Coumarin 6 beobachtet (Abb. 4-8 B). Im Unterschied zu den PCS-Ergebnissen erlaubte die Elektronenmikroskopie die Visualisierung von bis zu 500 nm großen Liposomen. Die Partikel der Nanoemulsionen zeigten sich unter dem Elektronenmikroskop als gleichmäßig rundlich und mit ähnlicher Größe, welche mit 150 bis 200 nm den PCS-Ergebnissen entsprach (Anhang, Abb. 8-2). Die Beladung mit Coumarin 6 führte auch hier nicht zu Formveränderungen.

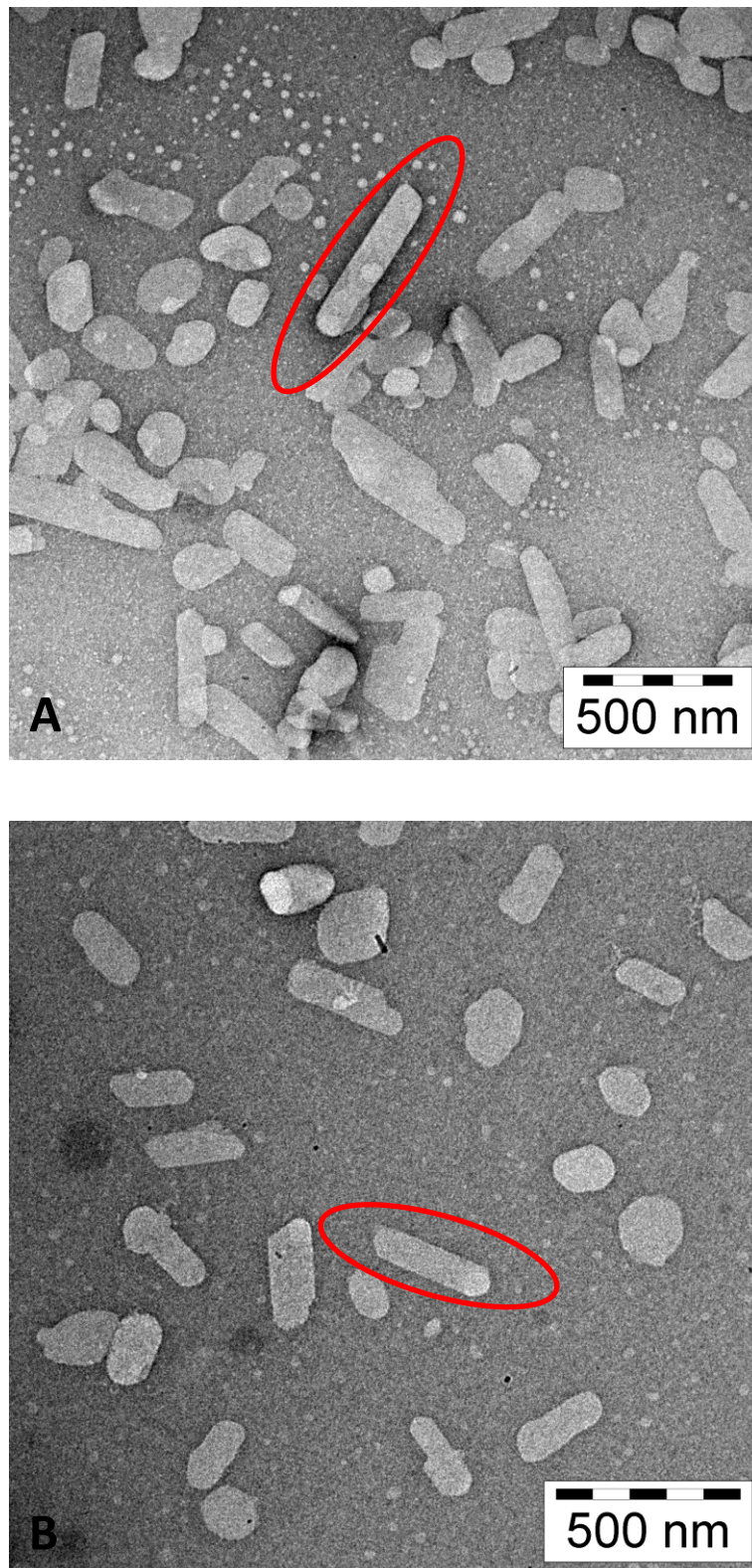


Abb. 4-7: TEM-Aufnahmen von unbeladenen (A) und mit Coumarin 6 beladenen SLN (B) nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat (Pretor et al. 2014).

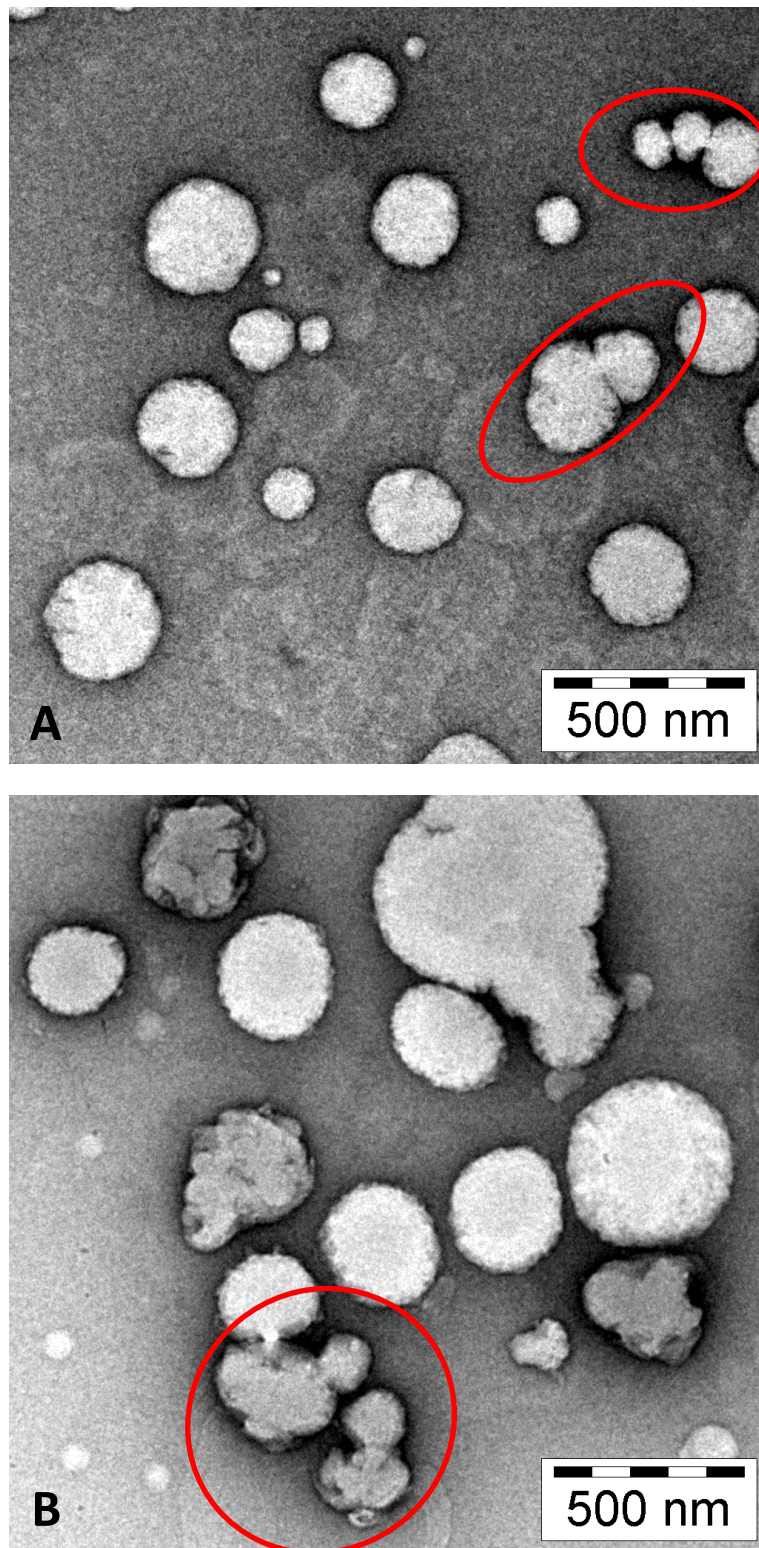


Abb. 4-8: TEM-Aufnahmen von unbeladenen (A) und Coumarin 6-beladenen Liposomen (B) (Pretor et al. 2014).

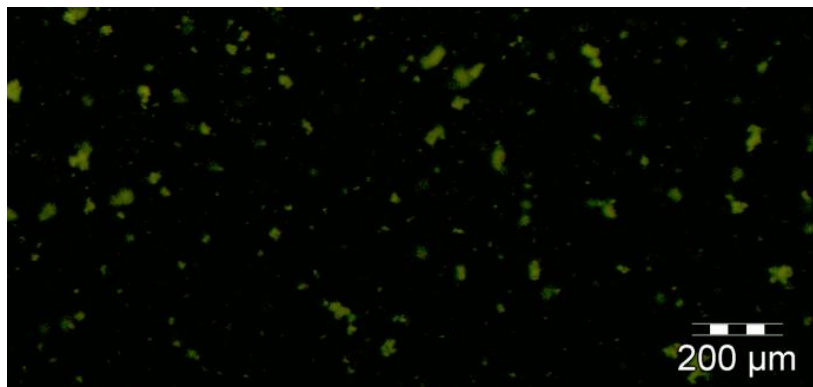


Abb. 4-9: Grün fluoreszierende Coumarin 6 Mikrokristalle in Suspension direkt nach der Präzipitation (Pretor et al. 2014).

Die Coumarin 6 Mikrokristalle konnten wegen der relativ geringen Partikelzahl und ihrer Größe ausschließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. Abschnitt 3.2.2.1) charakterisiert werden. Nach Anregung der Partikelfluoreszenz wurden unregelmäßig geformte Partikelagglomerate beobachtet, deren Größe im Bereich von 10 bis 50 μm lag (Abb. 4-9).

4.1.3 Osmolaritätsbestimmungen

Da die hergestellten Formulierungen mit vitalen Zellen in Kontakt gebracht werden sollten, wurde untersucht, ob der Anteil von 2 % (V/V) an Formulierung im verwendeten Krebs-Ringer-Puffer (KRB) einen Effekt auf dessen Osmolarität ausübt. Die Osmolarität des KRB lag mit 301 ± 3 mOsmol/L im plasmaisotonen Bereich und wurde durch Zusatz von 1000 μg Lipidmatrix pro mL nicht erhöht (302 ± 3 mOsmol/L). Da alle weiteren Formulierungen im gleichen Anteil zum KRB vorlagen wie SLN, wurde auf deren Untersuchung verzichtet.

4.1.4 Stabilität der Formulierungen in physiologischen Lösungen

Partikelgrößenmessungen nanoskaliger Formulierungen erfolgen in der Regel in demineralisiertem Wasser. Zellkulturmedien enthalten jedoch Elektrolyte, die pH-Wert und Osmolarität physiologischer Körperflüssigkeiten sicherstellen. Inwieweit Verdünnungen der untersuchten Formulierungen mit PBS-Puffer deren mittels PCS bestimmte Partikelgrößen beeinflussen, sollte in Abhängigkeit von einer steigenden Osmolarität untersucht werden.

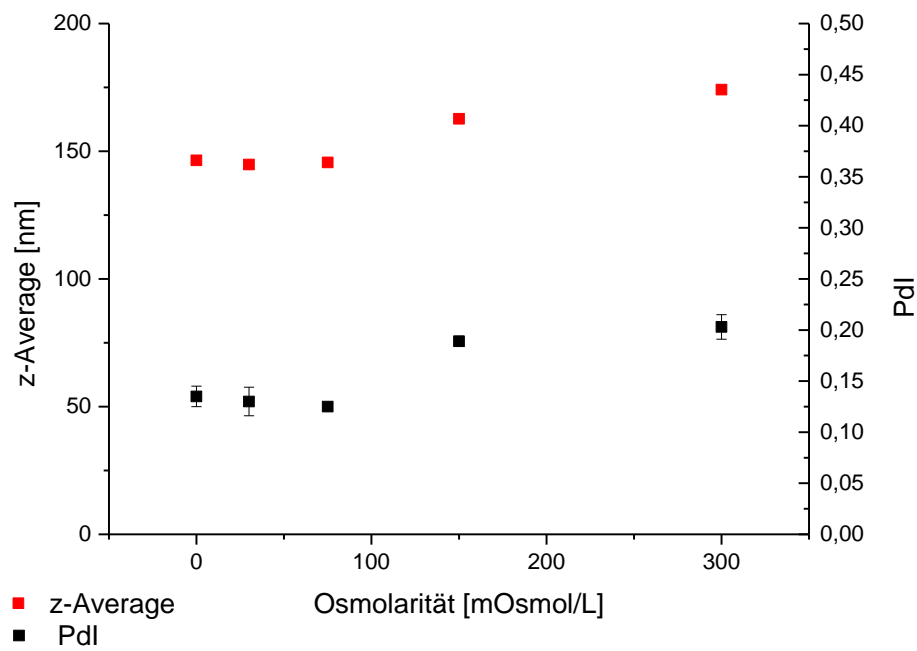


Abb. 4-10: Änderung von mittlerer Partikelgröße und Pdl von SLN mit zunehmender Osmolarität des umgebenden Mediums

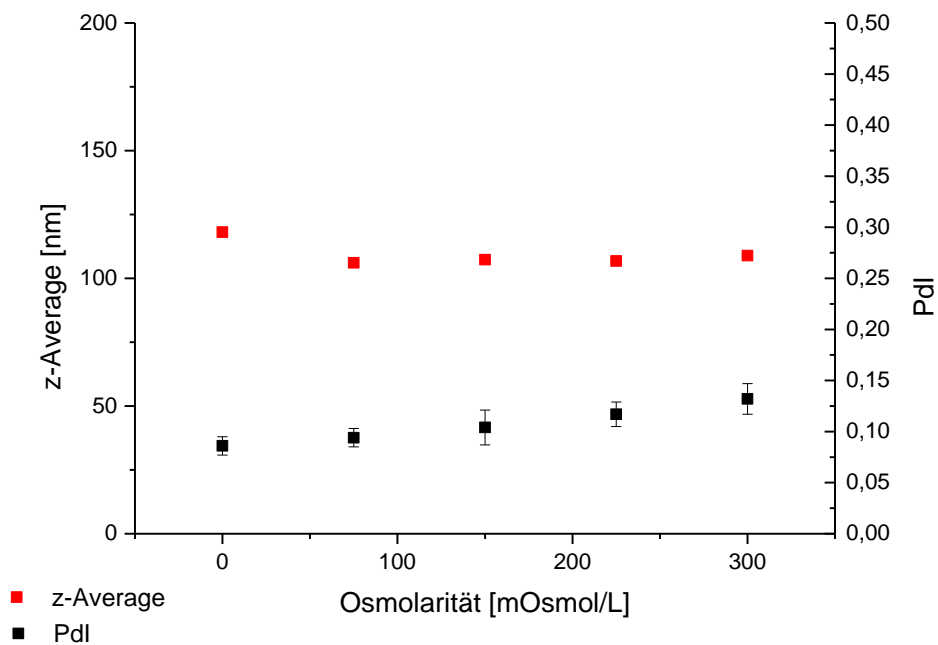


Abb. 4-11: Änderung von mittlerer Partikelgröße und Pdl von unbeladenen Liposomen mit zunehmender Osmolarität des umgebenden Mediums

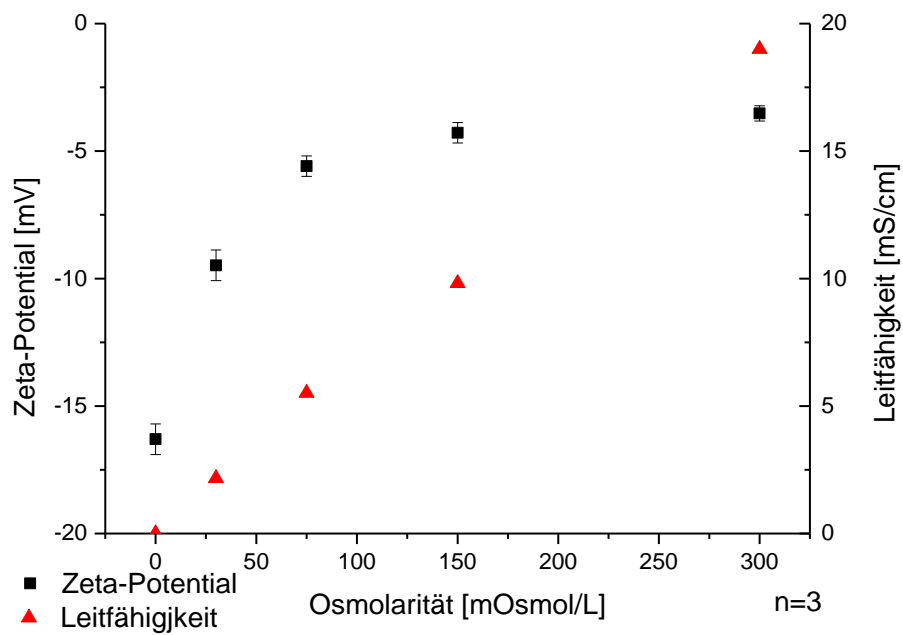


Abb. 4-12: Änderung des Zeta-Potentials unbelasteter SLN und Änderung der Mediumleitfähigkeit mit zunehmender Osmolarität des umgebenden Mediums.

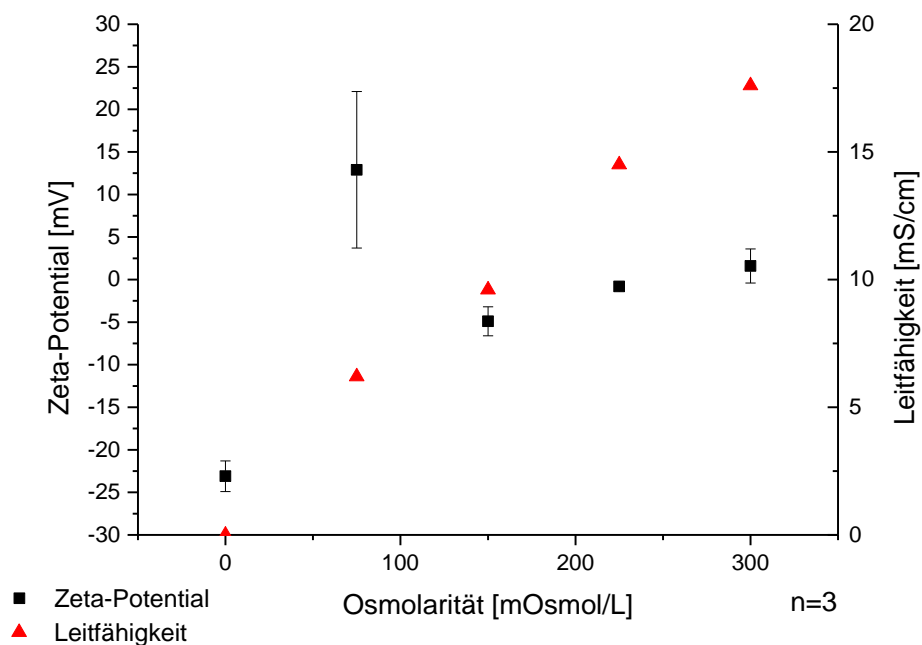


Abb. 4-13: Änderung des Zeta-Potentials unbelasteter Liposomen und Änderung der Mediumleitfähigkeit mit zunehmender Osmolarität des umgebenden Mediums

Im Falle der SLN änderte sich bis zu einer Osmolarität von 100 mOsmol/l weder der mittlere Partikeldurchmesser noch der PdI. Bei 150 mOsmol/l erfolgte ein sprunghafter Anstieg beider Werte um ca. 20 % (Abb. 4-10). Bei Liposomen nahm bei einer Mediumosmolarität von 75 mOsmol/l der z-Average zunächst etwas ab, um dann annähernd konstant bei circa 100 nm zu bleiben. Der PdI nahm hingegen von Werten um 0,1 auf 0,15 zu (Abb. 4-11). Ursache für die tendenzielle Veränderung von z-Average und PdI ist die Beeinflussung des Zeta-Potentials durch die im PBS gelösten Ionen. Dieser Erklärungsversuch sollte durch die zusätzliche Erfassung des Zeta-Potentials sowie die Messung der Leitfähigkeit des Umgebungsmediums (Konduktivität) als Maß für die Anzahl frei beweglicher Ionen überprüft werden. Das Zeta-Potential der SLN näherte sich mit zunehmender Osmolarität entsprechend einer Verhulst-Kinetik einem Wert von -4 mV (Abb. 4-12, Quadrate). Da die Konduktivität linear anstieg (Abb. 4-12, Dreiecke), konnte davon ausgegangen werden, dass eine zunehmende Osmolarität auch eine Zunahme der freien Ionen zur Folge hat, welche das Zeta-Potential der SLN-Formulierungen durch Anlagerung an die geladenen Schichten auf der Partikeloberfläche absenken. Das gleiche Phänomen wurde bei unbeladenen Liposomen, mit Ausnahme eines wahrscheinlich als Meßfehler zu interpretierenden Zeta-Potentials bei 75 mOsmol beobachtet (Abb. 4-13). Hier wurde sogar ein Zetapotential um 0 mV erreicht. Insgesamt betrachtet stieg der z-Average selbst nach Verdünnung der SLN bzw. Liposomen in reinem PBS mit 300 mOsmol nicht in den Mikrometerbereich und auch der PdI als Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung überschritt den kritischen Wert von 0,2 nicht, womit weiterhin eine monomodale Partikelgrößenverteilung vorlag. Damit ist davon auszugehen, dass die nanoskaligen Formulierungen im Zellkulturmedium während des Experiments stabil bleiben.

4.1.5 Beeinflussung der Partikeleigenschaften durch Polyelektrolyte

Polyelektrolyte sind Polymere mit funktionellen Gruppen, die eine permanente oder vom chemischen Milieu abhängige positive oder negative Ladung tragen. Bekannte Vertreter sind das positiv geladene Polyallylaminhydrochlorid (PAH) bzw. Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) und die negativ geladene Polyacrylsäure (PAA). Sie können mittels Adsorption oder kovalenter Bindung an Oberflächen gebunden werden und diesen somit Ladungen zuweisen, wodurch die Adsorption gleichgeladener Teilchen erschwert und die entgegengeladener Teilchen vereinfacht wird. So konnte die

Ablagerung von SLN und festen Wachsnanopartikeln mit negativem Zetapotential auf Stahloberflächen gezielt verstärkt werden, indem auf die Stahloberflächen zuvor eine PAH-Endschicht adsorbiert wurde (Finke et al. 2013). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass SLN ebenfalls mit Polyelektrolytschichten überzogen werden können, was ihr Zetapotential in die positive Richtung verschob (Ramasamy und Haidar 2011). Da die äußere Membran von Zellen negativ geladen ist, verspricht man sich von solchen Modifizierungen eine verstärkte Partikel-Zell-Interaktion.

In Tabelle 4-1 sind Partikelgröße (z-average), Polydispersitätsindex (PdI) und Zeta-Potential von SLN DiI dargestellt, welche für 24 Stunden mit jeweils 1 μM PAH- (SLN DiI PAH) bzw. PDADMAC-Lösung (SLN DiI PDADMAC), sowie für 48 Stunden mit einer Lösung aus positiv geladenem Poly-D-Lysin (0,1 mg/mL) inkubiert wurden. Des Weiteren sind diese Eigenschaften für SLN NBD und SLN NBD, welche für 24 Stunden mit einer 1 μM PAH-Lösung inkubiert wurden (SLN NBD PAH), aufgeführt. Zum Vergleich dient die Vermessung einer 100 μM PAH-Lösung ohne SLN, deren Ergebnisse jedoch aufgrund hoher Standardabweichung und eines hohen PdI kritisch zu bewerten sind. Die mit PAH inkubierten SLN zeigten eng verteilte mittlere Partikelgrößen, die je nach Fluorophormarkierung nicht (DiI) oder deutlich (NBD) zunahmen. Es ist offensichtlich, dass eine Interaktion zwischen SLN und Polyelektrolyt stattgefunden hat. Das Zeta-Potential von SLN DiI änderte sich nach Inkubation mit PAH von einem leicht negativen auf einen mit knapp 22 mV deutlich positiven Wert. Nach Inkubation mit Polylysin-Lösung zeigten SLN DiI eine um 40 % erhöhte mittlere Partikelgröße und einen um 16 % erhöhten PdI, jedoch mussten die Partikel 48 Stunden lang inkubiert werden, damit sich das Zetapotential auf rund 4 mV positivierte.

Im Falle von SLN NBD änderte sich das Zeta-Potential der Partikel von -27 mV auf knapp 18 mV. Noch deutlicher fiel diese Änderung bei der Inkubation mit PDADMAC insofern auf, als mit 36 mV ein noch höheres positives Zeta-Potential gemessen werden konnte und sich Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung um 20 bzw. 45 % vergrößerten. Das mit -27 mV deutlich negativere Zeta-Potential von SLN NBD dürfte die Hauptursache für den im Vergleich zu SLN DiI deutlich stärkeren Positivierungseffekt sein, da hierdurch auch eine größere Anziehungskraft auf das positiv geladene PAH ausgeübt werden konnte.

Tabelle 4-1: Partikelgröße (z. Av.), Partikelgrößenverteilung und Zeta-Potential (ζ -Pot.) von SLN DiI und SLN NBD, welche für 24 Stunden mit 1 μ M PAH bzw. im Falle von SLN DiI auch für 24 Stunden mit 1 μ M PDADMAC inkubiert wurden. Die Inkubation mit Poly-D-Lysin erfolgte für 48 Stunden bei einer Konzentration von 0,1 mg/mL. Zum Vergleich diente eine wässrige 100 μ M PAH-Lösung

Formulierung	z-Av.	sd	PdI	sd	ζ -Pot.	sd
	nm				mV	
SLN DiI	114,3	1,7	0,156	0,002	-3,4	0,2
SLN DiI PAH	112,7	0,8	0,144	0,013	21,7	0,5
SLN DiI PDADMAC	137,8	1,2	0,229	0,003	36,1	1,0
SLN-DiI Poly-D-Lysin 48 h	161,0	1,2	0,182	0,012	4,35	0,2
SLN NBD	100,9	1,1	0,238	0,008	-27,0	1,1
SLN NBD PAH	157,4	2,3	0,275	0,003	17,9	0,1
PAH 100 μ M	97,1	46,0	0,742	0,157	5,4	1,4

4.1.6 Einbringen und Nachweis funktioneller Gruppen in SLN

Abb. 4-14 zeigt die Fluoreszenzintensitäten verschiedener SLN-Formulierungen nach der in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Inkubation mit dem reaktiven Farbstoff DyLight 488[®], welcher spezifisch und kovalent an primäre aliphatische Aminogruppen bindet. Je höher die Intensität, umso mehr DyLight 488[®]-Moleküle sind nach dem Dialyseschritt mit den SLN assoziiert. Hiermit sollte nachgewiesen werden, dass es mit Hilfe von speziellen Phospholipiden wie DHPE möglich ist, funktionelle Gruppen auf der Oberfläche von SLN zu verankern, an die nach der Hochdruckhomogenisation weitere Moleküle, wie thermolabile Proteine und Peptide gebunden werden können. Das Phospholipid DHPE, welches mit einem Anteil von 10 % (m/m) in die Lipidmatrix der SLN eingearbeitet wurde, sollte freie primäre Aminogruppen auf der Partikeloberfläche zur Verfügung stellen. Mit einer Fluoreszenzintensität von nahezu 40000 a.u. zeigte sich nach der Inkubation von DyLight-488[®] mit DHPE-haltigen SLN (SLN10 DHPE Dy) und anschließender Dialyse, dass mittels DHPE in SLN eingebrachte funktionelle Aminogruppen kovalente Bindungen mit reaktiven Molekülen wie DyLight-488[®] knüpfen. Der Farbstoff reagiert nicht mit DHPE-freien SLN (SLN Dy), wie an der Fluoreszenzintensität, welche mit circa 4000 a.u. sogar niedriger als die der Kontrollformulierungen ausfiel, erkennbar ist. Damit kann auch nahezu ausgeschlossen werden, dass sich der Farbstoff z.B. durch Lösen in der Phospholipidhülle, ohne kovalent gebunden zu werden, mit den SLN assoziiert. Als Kontrolle wurden die

Fluoreszenzintensitäten von PBS, SLN und SLN mit einem Anteil von 10 % DHPE in der Lipidmatrix (SLN10DHPE) gemessen. Sie betrugen circa 5000 a.u. Durch die Äquivalenz der Intensitäten von PBS und SLN-Formulierungen wird deutlich, dass Streulicht keinen Einfluss auf die Fluoreszenz DyLight 488[®] haltiger SLN besitzt.

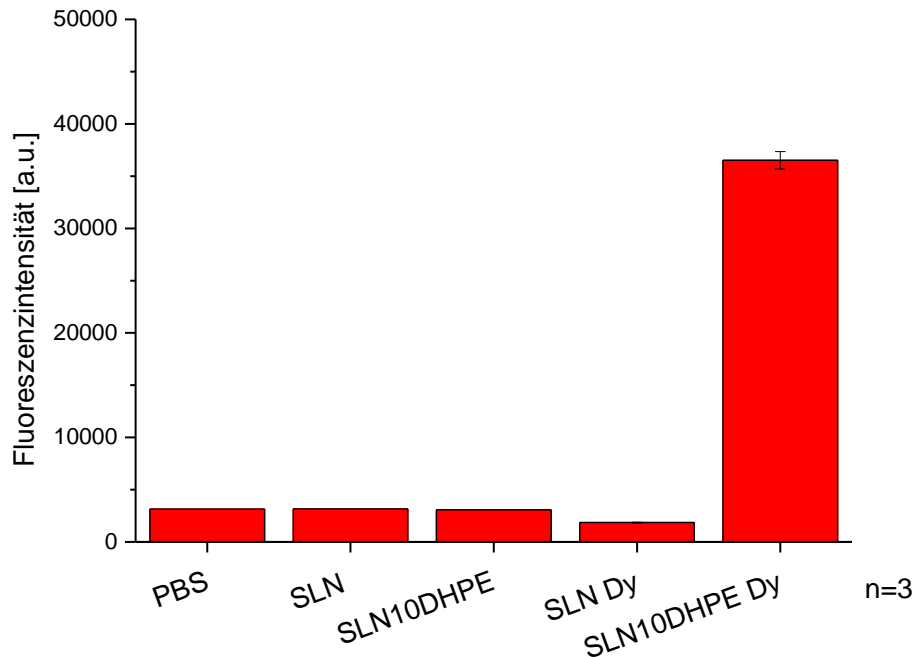


Abb. 4-14: Fluoreszenzintensitäten von DHPE-haltigen und DHPE-freien SLN-Formulierungen mit (SLN10DHPE Dy bzw. SLN Dy) und ohne Inkubation (SLN10DHPE bzw. SLN) mit dem reaktiven Farbstoff DyLight 488[®]

4.2 Zusammenfassende Diskussion Partikelherstellung und -Charakterisierung

Die gemessenen mittleren Partikeldurchmesser, Zeta-Potentiale sowie die Partikelform entsprachen im Falle von SLN und mit Coumarin 6 beladenen SLN denen aus Vorgängerarbeiten (SLN: Schubert und Müller-Goymann 2005, SLN mit Coumarin 6: Finke et al. 2014). Der Anteil von 0,025 % Coumarin 6 führte ebenso wenig zu einer Änderung der Partikelgröße wie die Einarbeitung der Farbstoffe DiI und Rhodamin B, welche als Partikelmarker bzw. Modellarzneistoff analog zu Vorgängerarbeiten eingesetzt wurden (Küchler et al. 2009, (Petersen et al. 2011)). Dennoch wurde für einen wachsenden Anteil an Coumarin 6 eine tendenzielle Partikelgrößenzunahme aller Formulierungen festgestellt. Die Herstellung von SLN unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Phospholipide führte zu einer

deutlichen Abnahme von Partikelgröße und Zeta-Potential. Letzteres ist auf den Einfluss der fluoreszenzmarkierten Phospholipide rückführbar, denn bei diesen wurde die negative Ladung der Phosphatgruppe im Unterschied zum Phosphatidylcholin nicht durch einen kationischen Cholinrest kompensiert. In der Summe führte dies zu einem negativen Zeta-Potential. Die Abnahme der Partikelgröße unter Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung könnte durch eine Änderung der oberflächenaktiven Eigenschaften des fluoreszenzmarkierten Phospholipidgemisches im Vergleich zu Phosphatidylcholin zustande gekommen sein. Dass die Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen wie Fettsäuren deren physikochemische Eigenschaften ändern kann, ist in der Literatur bereits beschrieben (Maier et al. 2002).

Allerdings führt auch die Verwendung anderer fluoreszenzmarkierter Ausgangsmaterialien zu unterschiedlichen Partikeleigenschaften. So bestehen sowohl SLN Suspensionen als auch Nanoemulsionen aus Triglyceriden, welche sich jedoch in der Länge der Kohlenwasserstoffketten und somit im Aggregatzustand unterscheiden. Die in der Mikrokanalanlage aus flüssigen Mittelkettigen Triglyceriden hergestellten Nanoemulsionen kristallisierten im Gegensatz zu den SLN beim Abkühlen nicht aus. Obwohl dadurch eine mögliche Ursache für eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung ausfällt, fielen die PDI der Nanoemulsionen nur in einem Fall (MCT ohne Coumarin 6) niedriger als bei SLN aus, im Falle einer Coumarin 6 Beladung waren sie mit denen der SLN vergleichbar bzw. fielen sogar höher aus (MCT-C 0,1 %). Es bestand jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen Partikelgröße und PDI auf der einen und dem Farbstoffanteil auf der anderen Seite. Ein Partikelgrößenwachstum allein aufgrund der Beladung ist bei den Nanoemulsionen somit weitgehend auszuschließen, viel mehr wäre ein beginnendes Auskristallisieren des Coumarin 6 als Ursache für die Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung in Betracht zu ziehen. Da kein Lecithin zur Stabilisierung verwendet wurde, fiel das Zeta-Potential möglicherweise aufgrund freier, deprotonierter Fettsäuren im Vergleich zu SLN negativer aus.

Partikelgröße und Partikelform der Liposomen stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, welche ähnliche Ausgangsstoffe und die gleiche Herstellungsart, nämlich die Extrusion durch eine Filtermembran, verwendeten (Berger et al. 2001). Hierbei entfällt die Redispergierung eines mittels organischer Lösungsmittel hergestellten Phospholipidfilms, sodass die Inkubation mit Zellen weniger risikobehaftet erscheint. Die Beladung mit Coumarin 6 erfolgte passiv, wobei anhand einer sich binnen Sekunden homogen gelbgrün färbenden Dispersion und eines PDI von weniger als 0,1 davon

ausgegangen werden konnte, dass sämtlicher Farbstoff in die Lipidhüllen eingelagert wurde und keine Ausfällung von Kristallen in die äußere wässrige Umgebung stattgefunden hat.

Die mizellaren Lösungen zeigten eine für Mizellen typische Größe, wobei sich der PdI mit Werten um 0,1 erst ergab, nachdem die Lösungen unter leichtem Erwärmen hergestellt wurden. Da die Herstellung der SLN-Formulierungen mit dem Macrogol-15-hydroxystearat ebenfalls bei erhöhter Temperatur stattfand, kann davon ausgegangen werden, dass eventuell in diesen Systemen vorhandene Mizellen im gleichen Größenbereich liegen.

Die Coumarin 6 Mikropartikel waren im Vergleich zu Untersuchungen anderer Gruppen deutlich größer (Fery-Forgues et al. 2008). Diese verwendeten jedoch mit Aceton ein anderes Lösungsmittel, welches zudem mit 2 % in einer höheren Konzentration in der entstandenen Suspension vorlag. Außerdem war die Ausgangskonzentration an Coumarin 6 mit 0,035 % in der referierten Publikation deutlich geringer. Auch dort wurde auf einen Emulgator zur Stabilisierung der Partikel verzichtet. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen, da die Präzipitation immer zeitnah vor der Inkubation mit Zellen geschah, insbesondere um den Einfluss von mizellar inkorporiertem Coumarin 6 auf dessen Aufnahme in die Zellen vernachlässigen zu können.

In dieser Arbeit wurde auf die Untersuchung der Lagerungsstabilität von SLN verzichtet, da diese durch Vorgängerarbeiten hinreichend belegt ist (Paranjpe et al. 2014). Um die Stabilität der SLN und Liposomen in physiologischen Medien zu überprüfen, erfolgte die Messung der Partikelgröße in Abhängigkeit von der Mediumosmolarität. Da keine Partikelgrößenzunahme in den Mikrometerbereich erfolgte, war dies sowohl für SLN als auch für Liposomen, zumindest für einen kurzen Zeitraum von einer Stunde, gegeben. Auffällig war jedoch die sprunghafte Zunahme von Partikelgröße und PdI von SLN ab 150 mOsmol/L. Zusätzlich stellte sich ab dieser Osmolarität ein konstant niedriges Zeta-Potential der Partikel ein. Beide Phänomene lassen sich mit der Anlagerung von Kationen aus dem PBS an die negativ geladene Grenzschicht der SLN bzw. Liposomen erklären, wobei die Zunahme der Elektrolytkonzentration mit der Abnahme des Zeta-Potentials in einem nicht-linearen Zusammenhang steht (Freitas, C., Müller, R.H. 1998). Sobald demnach die Ladungen der diffusen Schicht der Partikel durch Gegenionen fast vollständig kompensiert werden, bedingen weitere Steigerungen der Elektrolytkonzentration keine weitere Ladungskompensation mehr. Dies war sowohl bei SLN als auch bei Liposomen ab einer Osmolarität von 150 mOsmol/L der Fall und begründet im Fall der SLN die sprunghafte Größenzunahme von z-Average und PdI, wobei die Macrogolketten des Emulgators für eine

sterische und von Elektrolyten unabhängige Stabilisierung sorgen, die ein weiteres Partikelwachstum verhindert. Da die Messung des Zeta-Potentials ein elektrisches Feld voraussetzt, führt dessen Abschwächung durch steigende Konzentration an Elektrolyten zu Messungenauigkeiten, wie in Abb. 4-13 am Beispiel des vermuteten Messfehlers deutlich zu sehen ist. Interessanterweise wurden in der Literatur bereits Unwägbarkeiten bei der Bestimmung des Zeta-Potentials von Liposomen in Gegenwart von Elektrolyten beschrieben (Park et al. 2010). Warum dies gerade bei Liposomen zum Tragen kommt, konnte jedoch nicht begründet werden.

Anhand der Inkubation von SLN mit Polyelektrolyten konnte die gezielte Positivierung des Zeta-Potentials gezeigt werden, um die Adhäsion der Partikel an die negativ geladenen Zellmembranen zu verbessern. Obwohl nach der Inkubation keine abschließende Aufreinigung der Partikel stattfand und somit im PCS womöglich auch nichtadsorbierte PAH-Moleküle mitvermessen wurden, kann diese Erhöhung des Zeta-Potentials nicht von freien PAH-Molekülen stammen. Gründe hierfür sind das mit 5,4 mV deutlich geringere Zeta-Potential der PAH-Moleküle in Lösung sowie die deutliche Größenzunahme der Partikel nach erfolgter Inkubation, was ein erster Hinweis für die Anordnung von Polymerschichten auf der Partikeloberfläche ist, aber durch Methoden wie die Röntgendiffraktometrie weiter untersucht werden müsste.

Da die Interaktion von SLN mit humanen Epithelzellen durch Änderung des Zeta-Potentials nur unspezifisch beeinflussbar ist, sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, im Mikromaßstab funktionelle Gruppen in SLN einzuarbeiten, welche die kovalente Kopplung von Proteinen oder Peptidsequenzen an die SLN-Oberfläche ermöglichen. Indem 10 % des Lecithins in der Lipidmatrix durch Phosphatidylethanolamin ersetzt wurde, sollten reaktive Aminogruppen für die Kopplung mit aktivierten Carboxylgruppen in die SLN eingefügt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Farbstoff DyLight[®], welcher mit Aminogruppen kovalente Bindungen eingeht, an die SLN gebunden werden konnte. Die Fluoreszenzintensität dieser Partikel fiel im Vergleich zu SLN allein und SLN ohne Phosphatidylethanolamin, welche mit DyLight[®] inkubiert wurden, signifikant höher aus, womit Streulichteffekte und unspezifische Kopplung des Farbstoffes als Ursachen für die Intensitätsunterschiede ausgeschlossen werden können. Die Aminogruppen sind trotz der raumfüllenden PEG-Gruppen des Macrogol-15-hydroxystearates für die Kopplung zugänglich, wobei für spätere Kopplungsreaktionen das Molekulargewicht der Proteine

berücksichtigt werden muss, welches deutlich über dem des Farbstoffes liegt und die Reaktion beeinträchtigen könnte.

4.3 Toxizität von Lipidnanopartikeln auf die verwendeten Zelllinien

4.3.1 Resazurin-Assay

Mit Hilfe des Resazurin-Assays wurde die Toxizität von unbeladenen und mit Coumarin 6 beladenen SLN-Formulierungen auf indirektem Wege über die Bestimmung der Viabilität an drei Zelllinien getestet. Abb. 4-15 und Abb. 4-16 zeigen die Zellviabilität von HCE-T Zellen in Abhängigkeit von der SLN-Konzentration, logarithmisch aufgetragen und dargestellt als Anteil Lipidmatrix in μg pro mL. Anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufes ließ sich für die mit Coumarin 6-beladenen und die Coumarin 6- freien Formulierungen die Konzentration ermitteln, bei der die Zellviabilität noch 50 % ihres Ausgangswertes betrug (LD_{50} -Wert). Dieser Wert betrug für unbeladene SLN $444 \mu\text{g/mL}$ und für SLN-C $261 \mu\text{g/mL}$. Somit schienen HCE-T Zellen auf SLN-C empfindlicher zu reagieren. Zum Vergleich fasst Tabelle 4-2 die LD_{50} -Werte für beide Formulierungen und HCE-T, A549 und MHEC5-T Zellen zusammen. Dabei nahmen die LD_{50} -Werte unbeladener SLN in der Reihenfolge $\text{HCE-T} < \text{MHEC5-T} < \text{A549}$ zu, d.h. die Empfindlichkeit der Zellen nahm in dieser Reihenfolge ab. Im Falle von SLN-C besaßen MHEC5-T Zellen einen höheren LD_{50} -Wert als A549 Zellen, somit nahm hier die Empfindlichkeit der Zellen in der Reihenfolge $\text{HCE-T} > \text{A549} > \text{MHEC5-T}$ ab. Anders als HCE-T Zellen reagierten MHEC5-T und A549 Zellen empfindlicher auf Coumarin 6-freieSLN als auf Coumarin 6-beladene SLN.

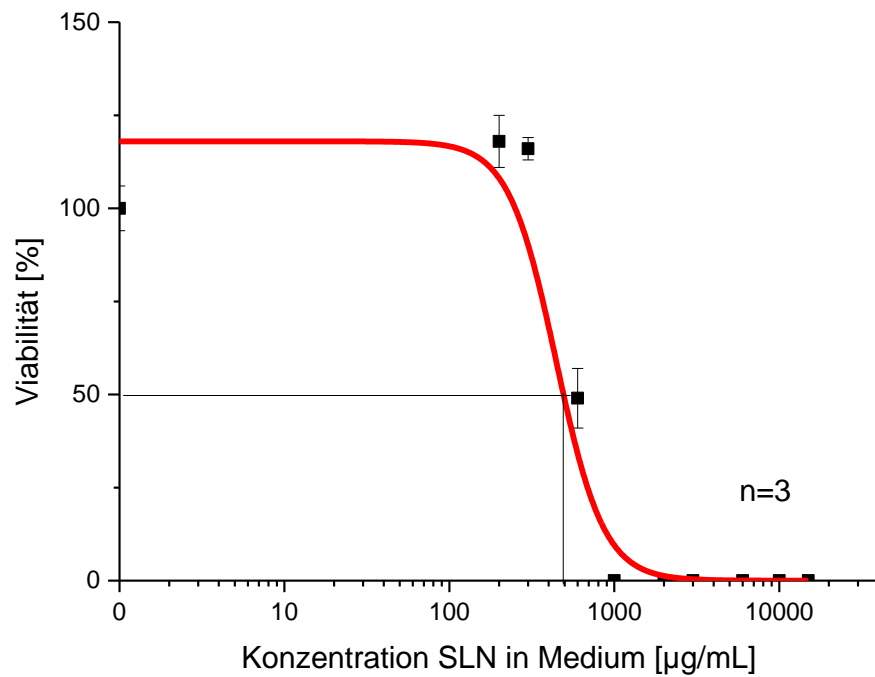


Abb. 4-15: Zellviabilität von HCE-T nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen unbeladener SLN

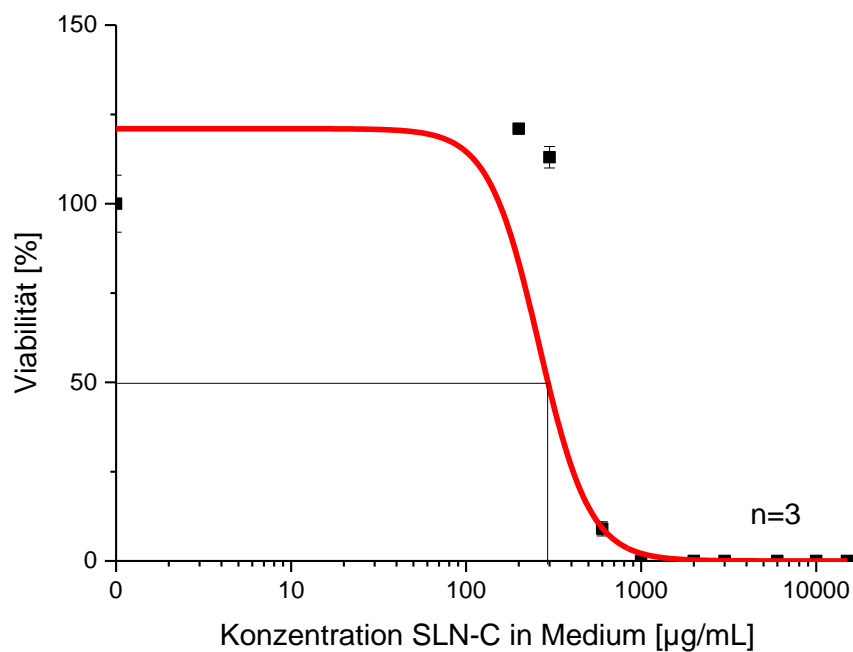


Abb. 4-16: Zellviabilität von HCE-T Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Coumarin 6-beladener SLN

Tabelle 4-2: Zusammenfassende Darstellung der mittels Resazurin-Assay ermittelten LD₅₀-Werte für unbeladene und mit Coumarin 6 beladene SLN-Formulierungen nach 24-stündiger Inkubation

Zellart	LD ₅₀ SLN [µg/mL]	LD ₅₀ SLN-C [µg/mL]	n	Inkubation [h]
HCE-T	444	261	3	24
MHEC5-T	1133	3056	3	24
A549	1558	2084	3	24

Da davon ausgegangen werden kann, dass bei einer *in vivo*-Applikation der Kontakt mit den Formulierungen deutlich weniger als 24 Stunden beträgt, wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde herabgesetzt. In diesem zeitlichen Rahmen fanden auch die späteren Live-cell-Imaging Untersuchungen statt (s. Abschnitt 3.2.7.2), die an HCE-T Zellen durchgeführt wurden, da diese den Kern der weiteren Untersuchungen bildeten. Zusätzlich zu den mit Coumarin 6-beladenen SLN wurden einstündige Inkubationen mit SLN-NBD durchgeführt. Eine Charge SLN-NBD wurde außerdem mit 5 % (m/V) Trehalose versetzt. Abb. 4-17 zeigt die Viabilität der HCE-T Zellen nach einstündiger Inkubation mit vier verschiedenen SLN-Formulierungen unterschiedlicher Konzentration.

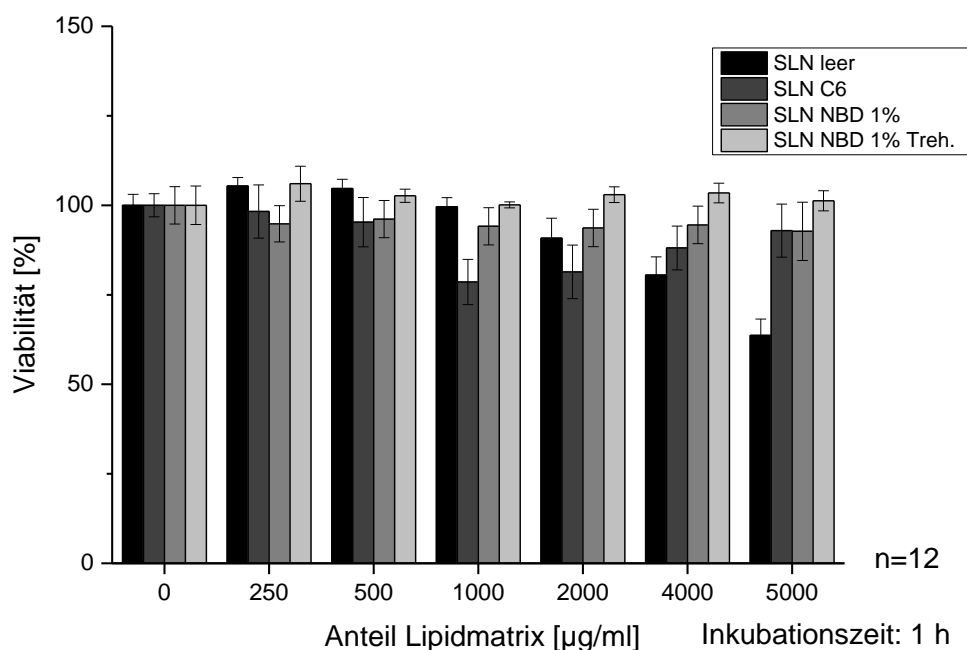


Abb. 4-17: Zellviabilität von HCE-T Zellen nach einstündiger Inkubation mit Verdünnungen verschiedener SLN-Formulierungen

Unbeladene SLN beeinträchtigten die Zellviabilität bis zu einem Lipidmatrixanteil von 2000 µg/mL kaum, wobei eine tendenzielle Zunahme auf Werte über 100 % beobachtet wurde. Höhere Konzentrationen ließen die Viabilität kontinuierlich absinken. Die Partikelkonzentration von 5000 µg/mL ließ die Viabilität auf 65 % absinken und wirkte somit laut ISO-Norm 10993-5, welche ein Absinken der Zellviabilität auf 70 % als zytotoxischen Effekt definiert, bereits toxisch auf HCE-T Zellen. SLN-C senkten die Zellviabilität ab einem Lipidmatrixanteil von 500 µg/mL. Ab 1000 µg/mL trat ein Viabilitätsminimum von 75 % auf, wobei die Zellviabilität bei höheren Konzentrationen erstaunlicherweise wieder anstieg, und dies ab einem Lipidmatrixanteil von 4000 µg/mL wieder fast bis auf den Ausgangswert von 100 %. Alle Konzentrationen von SLN NBD ohne Trehalose senkten die Zellviabilität, die bei einer Partikelkonzentration von 5000 µg/mL einen Wert von 90 % erreichte. Trehalosehaltige SLN NBD erhöhten die Zellviabilität sogar bis auf Werte von 105 % und zeigten somit keinen zytotoxischen Effekt für den untersuchten Zeitraum.

4.3.2 Zellviabilitätsfärbung

Da die Bestimmung der Zellviabilität mittels Quantifizierung mitochondrialer Redoxäquivalente keine Aussage zu strukturellen Zellschädigungen trifft, wurden HCE-T Zellen nach Inkubation mit unbeladenen SLN einer differenzierenden Fluoreszenzfärbung unterzogen. Vitale Zellen nehmen Calcein AM mittels Diffusion durch die Plasmamembran auf, spalten es mittels Esterasen zu ionisiertem Calcein, welches nach Calciumchelatisierung grün fluoresziert. Die zelluläre Aufnahme von Propidiumiodid hingegen findet nur bei membrangeschädigten Zellen statt und zeigt somit nicht-vitale Zellen an. SLN-C konnten in diesen Experimenten jedoch nicht untersucht werden, da sich die Emissionsspektren des Coumarin 6 und des Calceins überlagern. Die differenzierte Zellfärbung wurde mit HCE-T Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SLN in den Lipidmatrixkonzentrationen von 500, 750 und 1000 µg/mL durchgeführt. Als Negativkontrolle diente Kultivierungsmedium und es resultierte eine intensive grüne intrazelluläre Fluoreszenz (Anhang, Abb. 8-3). Mit zunehmender Partikelkonzentration verminderte sich die Fluoreszenzintensität des Calceins und es konnten in zunehmendem Maße rot fluoreszierende Zellkerne beobachtet werden. Der für die Färbung notwendige Waschprozess bedingte zudem ein Ablösen geschädigter Zellen, sodass mit steigender Partikelkonzentration die Zelldichte abnahm. Die Inkubation mit SLN in einer Konzentration von 500 µg/mL resultierte in einer kernzentrierten Calceinfluoreszenz

und zwei Zellen mit Propidiumiodidfluoreszenz (Anhang, Abb. 8-4). Einzelne zellfreie Bereiche legen ein teilweises Ablösen von Zellen nach dem Waschschrift nahe. Trotz der Überschreitung des mittels Resazurin-Assays bestimmten LD₅₀-Wertes bei 24-stündiger Inkubation erschienen die Zellen zum überwiegenden Teil vital. Die Erhöhung der SLN-Konzentration um 50 % auf 750 µg/mL bedingte eine deutliche Zunahme der Propidiumiodidfluoreszenz. Die Mehrzahl der Zellen war somit membrangeschädigt oder von der Wachstumsfläche abgelöst (Anhang, Abb. 8-5). Ein kompletter Verlust von Esteraseaktivität und Membranintegrität wurde nach der Inkubation mit 1000 µg/mL beobachtet (Anhang, Abb. 8-6). Das Erscheinungsbild der wenigen noch verbliebenen HCE-T Zellen glich denen der Positivkontrolle, welche mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin ihre Viabilität verloren hatten (Anhang, Abb. 8-7). Trotz leichter Abweichungen bestätigt die Zellfärbung die mittels Resazurin-Assay in Abhängigkeit von der SLN-Konzentration ermittelten Zellviabilitäten.

4.4 Zusammenfassende Diskussion Toxizität von Lipidnanopartikeln auf die verwendeten Zelllinien

Die Abwesenheit toxischer Wirkungen von SLN auf Zellen ist wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung der Partikel- und Modellarzneistoffaufnahme durch Epithel- und Endothelzellen. Die Komponenten der Lipidmatrix bestehen hauptsächlich aus Naturstoffen, was ein wesentlicher Grund für die im Vergleich zu Polymernanopartikeln deutlich geringere *in-vitro*-Toxizität ist. So haben sich Polyhexylcyanoacrylat- und PLGA-Nanopartikel als um ein Vielfaches toxischer erwiesen (Müller et al. 1997). Systematische Auswertungen von *in-vitro*-Toxizitätsuntersuchungen von SLN zeigen eine breite Streuung der LD₅₀-Werte, was in der Verwendung unterschiedlicher Zellarten, Inkubationszeiten und Viabilitätsassays begründet ist; jedoch lässt sich der LD₅₀-Wert von SLN grob in den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/mL einordnen (Doktorovova et al. 2014). Die in dieser Arbeit nach 24-stündiger Inkubationszeit bestimmten Werte weichen davon nur wenig ab und bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen (Nassimi et al. 2010b), wobei eine vollständige Vergleichbarkeit durch die Verwendung unterschiedlicher Viabilitätsassays (MTT und Resazurin) nicht möglich ist. Coumarin 6-beladene SLN schädigen A549 Zellen scheinbar stärker als MHEC5-T Zellen, ein Sachverhalt, der bei Paranjpe et al. 2013 auf mit Sildenafil (Base) beladene SLN zutraf. Die Übereinstimmung kann allerdings auch zufällig sein, da sich

Sildenafil und Coumarin 6 grundlegend in ihrer chemischen Struktur und in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Im Falle unbeladener SLN reagieren MHEC5-T in der vorliegenden Arbeit empfindlicher als A549, bei Paranjpe et al. 2013 stellt sich dieser Sachverhalt umgekehrt dar und betont die Wichtigkeit der Stichprobengröße, welche in der vorliegenden Arbeit aus Kapazitätsgründen leider nicht höher ausfallen konnte. Mit Macrogol-15-hydroxystearat wurde ein Emulgator verwendet, welcher für Formulierungen zur Anwendung am Auge geeignet ist, da mit ihm stabilisierte Trimyristinnanopartikel *in-vivo* vom Kaninchenauge ohne Schädigung toleriert wurden (Leonardi et al. 2014). Die verwendete Konzentration war dabei die gleiche wie für die in dieser Arbeit verwendeten SLN. Die Materialien der Lipidmatrix haben kaum Einfluss auf die Partikeltoxizität (Müller et al. 1997), jedoch scheint der physikalische Status der Partikel dahingehend von Bedeutung zu sein, dass kristalline Partikel stärkere Zellschädigungen hervorrufen als flüssige oder flüssigkristalline (Petersen et al. 2011).

Die Empfindlichkeit der HCE-T-Zellen *in vitro* könnte darin begründet liegen, dass sie *in vitro* einschichtig und nicht wie unter *in vivo*-Bedingungen mehrschichtig wachsen. Zudem fehlt die kollagenhaltige Ankerschicht, die Basallamina, was ein Ablösen der Zellen nach einer Irritation durch Nanopartikel begünstigt. Hiervon betroffene Zellen werden, obwohl durchaus noch vital, dem Testsystem entzogen und lassen das zu testende Agens toxischer erscheinen als es wirklich ist.

Da die HCE-T bei der 24-stündigen Inkubation mit SLN-C stärker geschädigt wurden als bei der Inkubation mit SLN, wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde und damit auf die ungefähre Dauer eines Flussexperiments, gekürzt. Die stärkere Schädigung durch SLN-C konnte hierbei bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde bei den Flussexperimenten (s. Abschnitt 4.7) die Zellzahl und die Membranintegrität vor und nach den Versuchen bestimmt. SLN-NBD zeigten keinerlei toxische Wirkung auf HCE-T, auch nicht unter dem Zusatz von 5 % Trehalose, was zu einer im Vergleich zum Blutplasma hypertonen Formulierung führt. Wahrscheinlich hat die Verdünnung mit Kultivierungsmedium eventuell zellschädigende Wirkungen der hypertonen Trehalose-stabilisierten SLN nivelliert. Die vorhandenen Unterschiede zwischen den Zellviabilitäten lassen sich eventuell darauf zurückführen, dass bei einer Inkubationszeit von nur einer Stunde zeitliche Abweichungen durch verzögertes Waschen o.ä. stärker ins Gewicht fallen. Durch eine randomisierte Anordnung der SLN-Konzentrationen auf der Mikrotiterplatte könnten derartige Einflussgrößen, allerdings zulasten der Übersichtlichkeit, minimiert werden. Insgesamt führt die kürzere und

realistischere Inkubationszeit von einer Stunde zu einer stark verringerten zellschädigenden Wirkung, bei der selbst eine Lipidmatrixkonzentration von 4000 µg/mL noch unkritisch ist.

4.5 Aufnahme von Coumarin 6 durch humane Epithel- und murine Endothelzellen unter statischen und unter Flussbedingungen

Der als Modellarzneistoff verwendete hydrophobe Fluoreszenzfarbstoff Coumarin 6 eignet sich zur Markierung von SLN, da er in einem Wellenlängenbereich von 450-500 nm angeregt werden kann, was mit den Filtereinstellungen der meisten Fluoreszenzmikroskope problemlos möglich ist. Nach 15 minütiger Inkubation von HCE-T mit SLN-C wurde im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der die Zellen nur mit Kultivierungsmedium inkubiert wurden, eine deutliche grüne Fluoreszenz detektiert (Abb. 4-18). Diese erschien homogen über die gesamte Zelle verteilt, lediglich der Zellkern blieb ausgenommen. Deutlich sichtbar war die Fluoreszenz in den äußeren Zellmembranen (Abb. 4-18, Pfeile). Des Weiteren ergab die Inkubation der Zellen mit LIP-C, MIC-C und Coumarin 6 in DMSO gelöst ein vergleichbares Fluoreszenzverteilungsmuster (Anhang, Abb. 8-28, Abb. 8-29 und Abb. 8-30). Ob Coumarin 6 aus den Nanopartikeln heraus- und in die Zellen hineindiffundierte oder mitsamt der Nanopartikel von den Zellen aufgenommen wurde, war anhand der Befunde nicht zu differenzieren. Es wurden daher SLN mit einem kovalent markierten fluoreszierenden Phospholipid (SLN-DHPE) hergestellt, deren Teilchengröße aufgrund des stärker grenzflächenaktiven Phospholipids sogar deutlich geringer ausfiel als die der Coumarin 6-beladenen SLN. Nach der Inkubation mit SLN-DHPE konnte jedoch keine Fluoreszenz detektiert werden (Anhang, Abb. 8-32). Diese SLN-DHPE wurden daher nicht partikulär von den Zellen aufgenommen. Um den Einfluss von innerhalb der SLN-Formulierungen mizellar solubilisiertem Coumarin 6 auf die zelluläre Übertragung des Farbstoffes zu untersuchen, erfolgte die Trennung der Lipidphase von der wässrigen Phase mittels Filtration. Obwohl das Filtrat leicht grüngelb gefärbt erschien, konnte in HCE-T Zellen, welche mit einer 1:10 Verdünnung des Filtrates mit Kultivierungsmedium inkubiert wurden, keine Fluoreszenz detektiert werden (Anhang, Abb. 8-31).

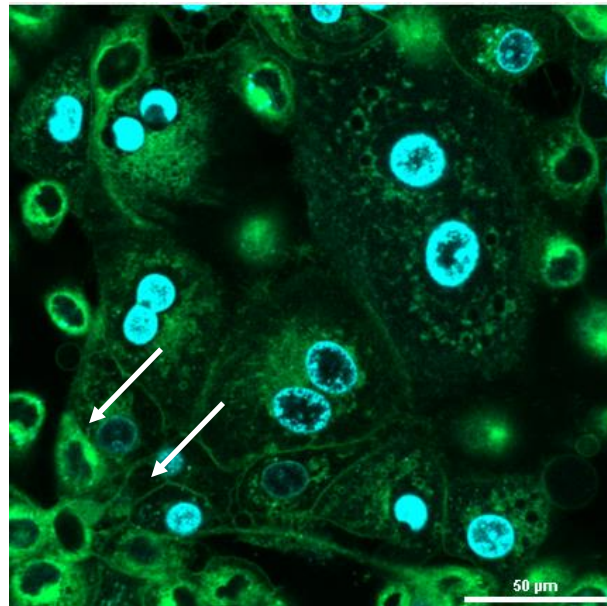


Abb. 4-18: HCE-T Zellen nach 15 Minuten Inkubation mit Coumarin 6 beladenen SLN unter Ruhebedingungen. Die blaue Fluoreszenz zeigt die mit Hoechst 33342 gefärbten Zellkerne.

Um zwischen einer oberflächlichen und einer intrazellulären Fluoreszenzverteilung zu differenzieren, wurden aus den einzelnen Bildebenen z-Stapel der Zellen aufgenommen und zu dreidimensionalen Aufnahmen zusammengesetzt. Sie zeigten, dass die Coumarin 6 Fluoreszenz vom Zellinneren und nicht ausschließlich von den äußeren, die Zellen begrenzenden Strukturen herrührte (Abb. 4-19). Dabei zeigte sich der mit Hoechst 33342 gefärbte Zellkern als Erhebung innerhalb der flachen Zellen, um den herum sich z.T. grün fluoreszierende, rundliche Vesikel gruppierten (Abb. 4-19, Pfeile).

Noch deutlicher kamen diese Vesikel bei HCE-T Zellen zur Geltung, welche mit SLN-C umströmt worden sind. Dabei kam das in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Flusssystem (Abb. 3-10) zum Einsatz, wobei eine Flussrate von 0,5 mL/min eingestellt wurde, welche einem Scherstress von 0,5 Pa entsprach. Abb. 4-20 zeigt die HCE-T Zellen nach der Umströmung und anschließender Fluoreszenzfärbung der Zellkerne. Im Allgemeinen war kein Unterschied zur Inkubation unter Ruhebedingungen erkennbar, weil sich das Coumarin 6 auch bei Umströmung ubiquitär über die Zellen verteilte. Die in direkter Nähe zum Zellkern beobachteten grün fluoreszierenden Vesikel (Abb. 4-20, Pfeile) waren jedoch zahlreicher als unter Ruhebedingungen. Zudem schien der Zellrasen weniger dicht als nach der Inkubation unter Ruhebedingungen zu sein. Die unterschiedlichen Inkubationsarten haben die Zellmorphologie nicht verändert. Auch im Mikroflusskanal zeigte sich der Zellkern als zentrale Erhebung der ansonsten flachen Zellkörper.

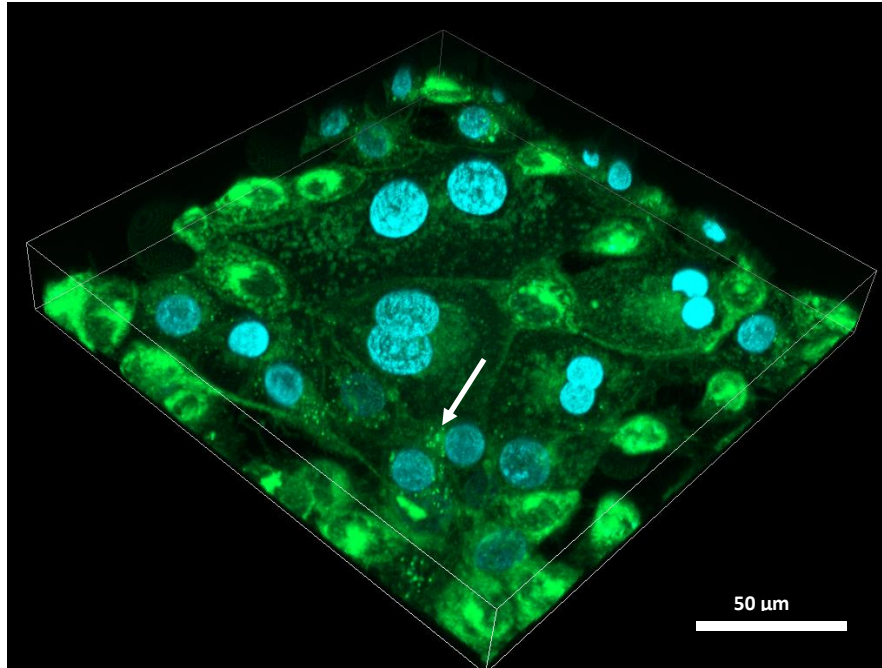


Abb. 4-19: 3-dimensionale Darstellung von HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit SLN-C. Die blaue Fluoreszenz zeigt die mit Hoechst 33342 gefärbten Zellkerne.

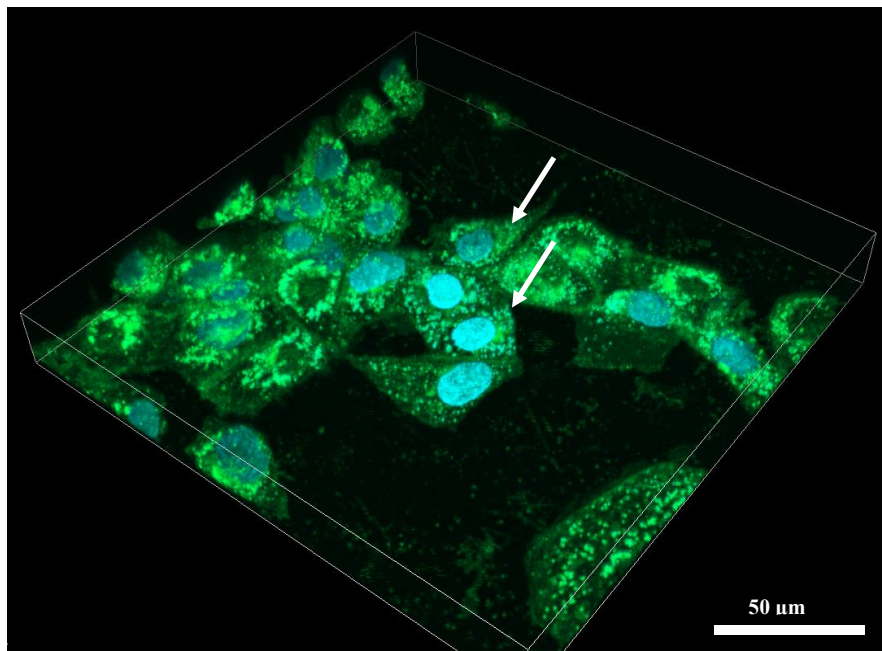


Abb. 4-20: 3-dimensionale Darstellung von HCE-T Zellen nach 15-minütiger Umströmung mit SLN-C unter einem Scherstress von 0,5 Pa. Die blaue Fluoreszenz zeigt die mit Hoechst 33342 gefärbten Zellkerne.

Die Interaktion von SLN unter Ruhebedingungen wurde zusätzlich mit der humanen Alveolarepithelzelllinie A549, der Bronchialepithelzelllinie CaLu-3 und der murinen Gefäßendothelzelllinie MHEC5-T untersucht. Hierzu wurden zusätzlich zu SLN-C auch SLN-DHPE verwendet, um zwischen der Aufnahme der Partikel und der Aufnahme des Farbstoffes Coumarin 6 differenzieren zu können. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Nährmedium (Anhang, Abb. 8-8, Abb. 8-11 und Abb. 8-14). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung waren nach einstündiger Inkubation mit SLN-C bei A549 und CaLu-3 Zellen großflächige grün fluoreszierende Bereiche erkennbar, welche sich um die blau fluoreszierenden Zellkerne erstreckten (Anhang, Abb. 8-9 und Abb. 8-12). Innerhalb der Zellkerne wurde keine grüne Fluoreszenz detektiert. Der gleiche Befund ergab sich für MHEC5-T Zellen, jedoch mit dem Unterschied einer deutlich geringeren Intensität der Coumarin 6 Fluoreszenz und deutlich kleineren grün fluoreszierenden Bereichen. Bei diesen Zellen dominierte der relativ große Zellkern das Bild (Anhang, Abb. 8-15). Nach der einstündigen Inkubation mit SLN-DHPE konnte bei keiner der Zellarten, im Vergleich zur Negativkontrolle, ein grünes Fluoreszenzsignal detektiert werden, was eine Aufnahme oder Adsorption der Partikel in bzw. an die Zellen unwahrscheinlich macht (Anhang Abb. 8-10, Abb. 8-13 und Abb. 8-16). Die konfokalmikroskopische Untersuchung bestätigte diese Befunde, wie Abb. 4-21 am Beispiel von MHEC5-T Zellen zeigt.

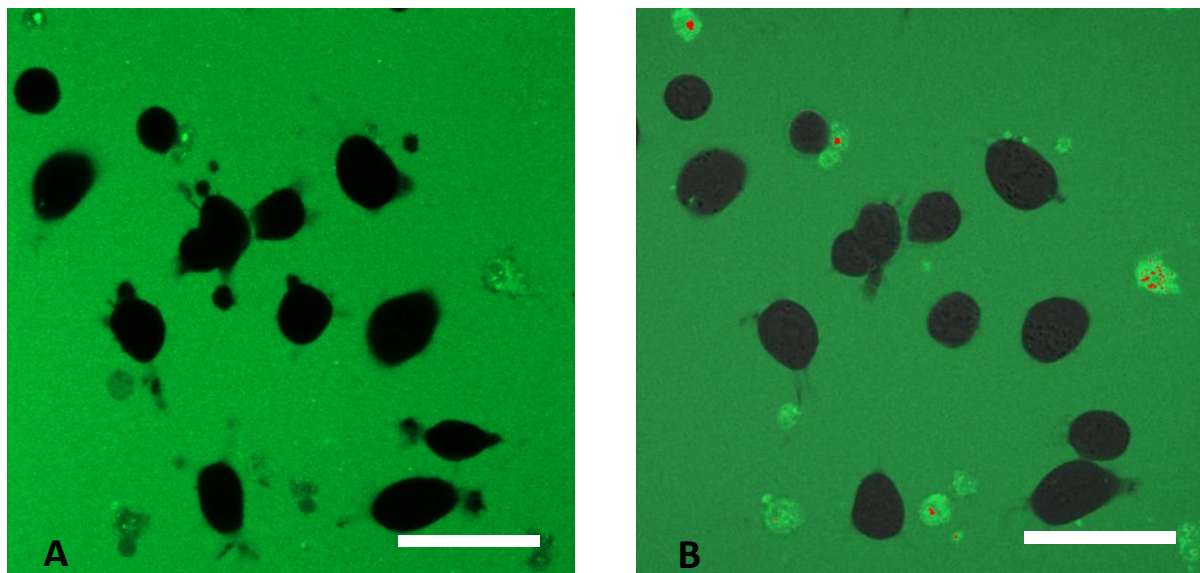


Abb. 4-21: (A) MHEC5-T Zellen nach zweiminütiger Inkubation mit SLN-DHPE. Auf eine Kernfärbung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Zellkörper erscheinen als dunkle Bereiche in der grün fluoreszierenden Umgebung in Form der SLN-DHPE Formulierung. (B) Die gleichen Zellen nach einer Stunde. Die Zellkörper erscheinen unverändert dunkel und mit gleicher Ausdehnung. Der weiße Messbalken repräsentiert 50 μm .

Nach zweiminütiger Inkubation von MHEC5-T Zellen mit SLN-DHPE und gleichzeitiger Beobachtung mittels CLSM zeigten sich die Zellkörper als dunkle Flächen, welche von der grün fluoreszierenden Nanosuspension umgeben waren (Abb. 4-21 A). Die Zellkörper blieben auch nach einstündiger Inkubation unverändert in ihrer Ausdehnung und geometrischen Form (Abb. 4-21 B). Der Vergleich mit der Inkubation von A549 und MHEC5-T Zellen mit SLN-C zeigt, dass dort bereits nach zwei Minuten eine intensive grüne Fluoreszenz um die Kerne der jeweiligen Zellen detektiert werden konnte, welche sich deutlich von der weniger intensiven Fluoreszenz in der Zellumgebung abhob (Abb. 4-22 A und B). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Färbung des Zellkerns verzichtet. Dieser trat deshalb als dunkle Fläche innerhalb der Zellkörper in Erscheinung und blieb während der gesamten Dauer der Untersuchungen (ca. 1 Stunde) in gleicher Weise erhalten. Da die erhaltenen Ergebnisse nahelegten, dass die Übertragung des Coumarin 6 auf die Zellen unabhängig von einer aktiven zellulären Aufnahme der SLN ist, wurden A549 und CaLu-3 Zellen mit SLN DiI inkubiert. Durch die im Vergleich zu Coumarin 6 größere Lipophilie von DiI und dessen bevorzugte Lokalisation in den SLN ist die Wahrscheinlichkeit einer passiven Diffusion von DiI in lipophile Bereiche der Zellmembranen deutlich geringer (Bastiat et al. 2013). Zusätzlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein positives Zeta-Potential die Adsorption der SLN an die Zellen ermöglicht. Aus diesem Grund erfolgte die Inkubation mit polyelektrolyt-modifizierten und DiI-beladenen SLN (SLN DiI PAH), deren Eigenschaften in Abschnitt 4.1.2 beschrieben wurden.

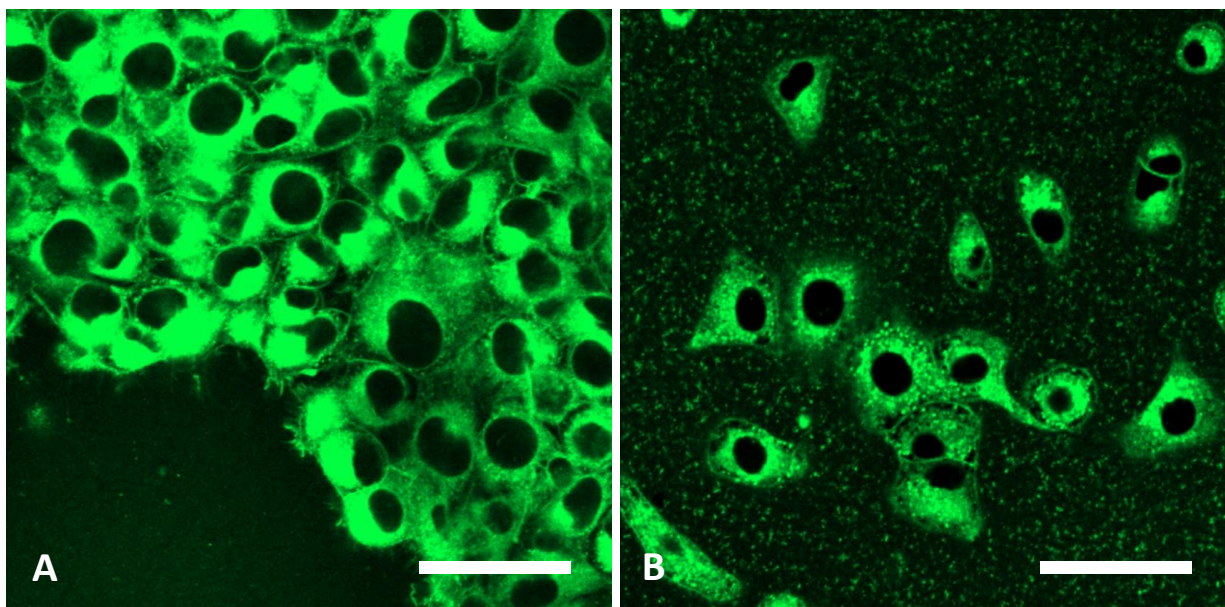


Abb. 4-22: (A) MHEC5-T und (B) A549 Zellen nach zweiminütiger Inkubation mit SLN-C. Der weiße Messbalken repräsentiert 50 μm .

Nach zweistündiger Inkubation der beiden Zelllinien mit SLN DiI, SLN DiI PAH und SLN DiI PDADAMAC wurde kein Fluoreszenzsignal des DiI innerhalb des Zytosols detektiert (Anhang, Abb. 8-17 bis Abb. 8-25). Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit Kultivierungsmedium mit anschließender Fluoreszenzfärbung der Zellkerne. Lediglich nach der Inkubation von HCE-T mit Poly-D-Lysin-modifizierten SLN DiI ließen sich einige schwach rot fluoreszierende Punkte in Zellnähe detektieren (Abb. 8-26, grüne Markierungen). Somit ließ sich durch Adsorption von Polyelektrolyten, welche mit einer Positivierung des Zeta-Potentials einherging keine verstärkte Partikelaufnahme und lediglich in einem Fall eine geringgradig verstärkte Partikeladsorption an die Zellen erreichen.

4.6 Zusammenfassende Diskussion zur Aufnahme von Lipidnanopartikeln und Coumarin 6 durch humane Epithel- und murine Endothelzellen unter Ruhe- und unter Flussbedingungen

Die aktive Aufnahme von Nanopartikeln durch Zellen wird häufig mit fluoreszenzmarkierten Partikeln durchgeführt, welche als Agglomerate fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, muss sichergestellt werden, dass die zur Markierung verwendeten Farbstoffe nicht von den Partikeln in benachbarte Zellkompartimente diffundieren. Dieses Phänomen ist bereits für Coumarin 6 markierte PLGA-Partikel beschrieben worden (Pietzonka 2002). Aus diesem Grund ist die aktive Aufnahme fester, Coumarin 6-beladener Lipidnanopartikel durch humane Epithelzellen nicht zweifelsfrei belegbar (Plajnšek et al. 2011). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zeiträume für das Erscheinen intrazellulärer Coumarin 6 Fluoreszenz deuten ebenfalls auf eine Farbstoffverteilung mittels passiver Diffusion hin, wenn auch für die endozytotische Aufnahme von Nanopartikeln kurze Zeiträume von einigen Minuten berichtet werden (Hemmerich et al. 2013). Ein weiterer Hinweis für die Farbstoffdiffusion ist die übereinstimmende intrazelluläre Fluoreszenzverteilung nach Inkubation mit liposomal und mizellar solubilisiertem Coumarin 6 und besonders nach der Inkubation mit in DMSO gelöstem Coumarin 6, welches sich wegen der schlechten Wasserlöslichkeit unabhängig von der verwendeten Formulierung direkt in die lipophilen Zellkompartimente umverteilt. Coumarin 6 ist demnach weniger ein Partikelmarker, sondern eignet sich mehr als lipophiler Modellarzneistoff, um den Transport schwerlöslicher Arzneistoffe mittels kolloidaler Arzneistoffträger an entsprechende Wirkorte zu untersuchen.

Zu diesen Wirkorten zählt auch das Auge mit der Cornea als präfrontaler Barriere mit Lidschlag und Tränenfluss als Befeuchtungs- und Reinigungsmechanismen, welche die topisch applizierte Arzneistoffmenge am Auge deutlich mindern. Deshalb erfolgte die Umströmung der HCE-T Zellen mit SLN-C in mikrofluidischen Strömungskanälen und der Vergleich zur Inkubation unter Ruhebedingungen. Da die Literatur darauf hinweist, dass Nanopartikel die Zellen berühren müssen, um den mitgeführten Farbstoff auf sie zu übertragen (Pietzonka 2002), müsste die Übertragung unter Flussbedingungen wegen kürzerer Kontaktzeiten vermindert sein und folglich zu einer geringer ausgeprägten Fluoreszenz der umströmten Zellen führen. Die Fluoreszenzintensitäten von Zellen, die unter Ruhe- und unter Flussbedingungen mit SLN-C inkubiert wurden, erwiesen sich jedoch als vergleichbar. Womöglich ist die Inkubationszeit mit 15 Minuten zu lang gewesen um einen sichtbaren Unterschied feststellen zu können, somit wurde für die weiteren Untersuchungen das Live Cell Imaging (s. Abschnitte 4.6 und 4.7) zur Untersuchung der Farbstoffübertragung gewählt.

Die Inkubation mit Partikelfiltrat zeigt, dass das an die Zellen abgegebene Coumarin 6 ausschließlich aus den Partikeln und nicht aus Mizellen der wässrigen Phase stammt, welche von überschüssigem Solutol-HS-15 ausgebildet wurden. Die geringe Filtratmenge erforderte die Anpassung von pH-Wert und Osmolarität durch Verdünnung mit PBS Puffer. Das hierzu anstatt 1:50 gewählte Verhältnis von 1:10 hätte die Nachweisbarkeit von mizellar gelöstem Coumarin 6 erhöhen sollen, da die für die Inkubationsversuche mit SLN-C gewählte Verdünnung bei 1:50 aufgrund zu geringer Farbstoff- und Mizellkonzentration zu einem falsch negativen Ergebnis geführt hätte.

Die kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffmolekülen an Partikelkomponenten stellt eine Möglichkeit dar, den intrazellulären Verbleib von Nanopartikeln zu untersuchen (Suh et al. 1998). Die verwendeten SLN-DHPE wurden in keiner der verwendeten Zelllinien detektiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass prinzipiell jede lebende Zelle zur Endozytose fähig ist. Ob und wie ein körpereigener oder –fremder Stoff aufgenommen wird, hängt jedoch sowohl von der Art der Zelle als auch von den Eigenschaften des aufzunehmenden Objektes ab. So inkorporieren Makrophagen wie die murine RAW 264.7 Zelllinie mehr Polystyrolnanopartikel als Epithelzellen wie solche der HeLa Zelllinie; dies galt in der entsprechenden Arbeit jedoch nur für Partikel mit weniger als 500 nm mittlerem Partikeldurchmesser; größere Partikel wurden generell nicht inkorporiert (dos Santos et al. 2011; Firdessa et al. 2014). Zusätzlich bestehen verschiedene Inkorporationsmechanismen, welche sich pharmakologisch, beispielsweise mit Nystatin, inhibieren lassen. So werden

Partikel mit einem Durchmesser von mehr als 150 nm hauptsächlich Clathrin- und Caveolin-vermittelt inkorporiert (Dausend et al. 2008). Dies träfe demnach auch für einen Teil der in dieser Arbeit verwendeten SLN zu, wenn man die Partikelgröße als ausschlaggebendes Kriterium betrachtet, jedoch weniger für die SLN-DHPE, die einen deutlich kleineren mittleren Partikeldurchmesser aufwiesen als SLN-C. Eine Vergleichbarkeit beider Partikelarten ist somit nur bedingt gegeben und auch die Partikelgröße ist nicht allein ausschlaggebend für Art und Ausmaß der zellulären Inkorporation. Einen weiteren Einflussfaktor stellt die Partikelform dar. So wurde beobachtet, dass im Vergleich zu zylinderförmigen Silikatnanopartikeln solche mit kugelförmiger Gestalt vermehrt aufgenommen wurden, wobei auch hier eine Inkorporation durch Epithelzellen repräsentierende A549 Zellen kaum stattfand (Herd et al. 2013). Dies bestätigt die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse trotz unterschiedlicher Partikelgrundstoffe insofern, als die Epithelzellen der untersuchten Zelllinien feste Lipidnanopartikel *in vitro* somit kaum aktiv aufnehmen. Im Falle der Cornea konnte jedoch *ex vivo* die Aufnahme von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln nachgewiesen werden, welche mit 120 nm mittlerem Partikeldurchmesser und einem Zeta-Potential von -5 mV ähnliche Eigenschaften wie SLN besaßen und die Tight-junction-Barriere aufgrund ihrer Größe nicht durchdringen konnten (Zimmer et al. 1991). In diesem Zusammenhang sei jedoch auf die unterschiedlichen Partikelmaterien sowie den bovinen Gewebeursprung in der Studie hingewiesen, welche eine direkte Vergleichbarkeit erschweren. Gegen die aktive Partikelaufnahme spricht zudem, dass die Corneaepithelzellschicht primär eine Barriereeinheit darstellt, welche das Eindringen von Fremdkörpern, besonders von pathogenen Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa*, verhindern soll (Fleiszig, S. M. J. et al. 2001). Untersuchungen des Eindringvermögens von Nanopartikeln in die Cornea am Beispiel von Stromazellen- wie z.B. von Sharma et al. 2011 untersucht- machen aus diesem Grund wenig Sinn, da das Epithel fehlt, welches *in vivo* das weitere Eindringen von Nanopartikeln in das corneale Stroma verhindern würde (Kuo et al. 2011).

Das schnelle Auswaschen von am Auge topisch applizierten Arzneistoffen soll durch die Verwendung kationischer Nanopartikel verzögert werden, da diese durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Mucinschicht des Corneaepithels länger am Applikationsort verbleiben (Fangueiro et al. 2014). Die in dieser Arbeit mittels Polyelektrolyten erreichte Positivierung des Zeta-Potentials führte jedoch nicht zu einer verbesserten Partikelaufnahme bzw. nur in einem Fall zu einer gering gesteigerten Partikeladhäsion. Dies könnte durch das elektrolytreiche Inkubationsmedium bedingt sein, das

das elektrische Feld zwischen positiv geladenen Partikeln und negativ geladener Zelloberfläche abschwächt. Mit Verweis auf Abschnitt 4.1.4 könnte das elektrolytreiche Inkubationsmedium auch zu einem Ablösen der Polyelektrolytmoleküle von der Partikeloberfläche führen und somit die Interaktion mit den Zellen mindern.

4.7 Live Cell Imaging und Fluorimetrie unter statischen Bedingungen

4.7.1 Live Cell Imaging

Mit Hilfe des Live Cell Imaging (s. Abschnitt 3.2.7.2) konnten sowohl die mit Coumarin 6 beladenen Arzneistoffträger als auch HCE-T Zellen während der Übertragung des Modellarzneistoffes simultan beobachtet werden. Abb. 4-23 zeigt die Entwicklung der Fluoreszenzintensitätsdifferenzen über einen fünfminütigen Betrachtungszeitraum. Coumarin 6 Mikrokristalle (SUS-C) sorgen für einen annähernd linearen Anstieg der Intensitätsdifferenz auf ca. 300 a.u. und übertragen den Modellarzneistoff am langsamsten. Der von Liposomen (LIP-C) übertragene Anteil an Coumarin 6 in dieser Zeitspanne ist signifikant größer als der von SLN. Insgesamt liefern die beiden nanoskaligen Systeme den Modellarzneistoff schneller und in signifikant höherem Ausmaß an die Zelle als die Mikrokristalle. Letzteres wird durch den Anstieg der AUC (area under curve) verdeutlicht (Abb. 4-24). Hierbei wurde die Fläche unter den Kurven von Abb. 4-23 bestimmt und in Flächeneinheiten (FE) dargestellt. Der Anstieg der AUC erfolgte in Form einer Sättigungskinetik in der Reihenfolge SUS-C < SLN-C < LIP-C (709,8 FE < 1698,4 FE < 2131,2 FE).

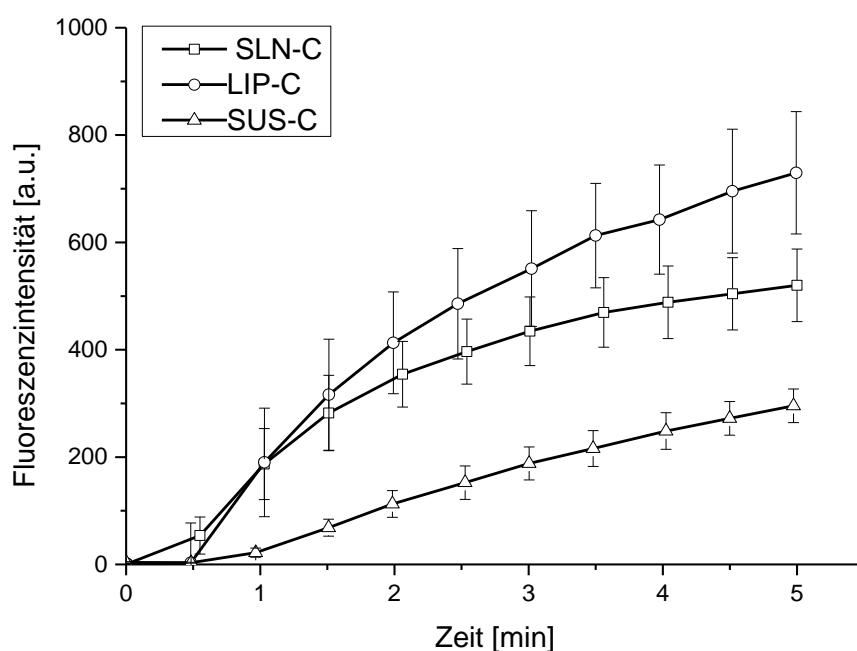


Abb. 4-23: Fluoreszenzintensitätsdifferenzen von HCE-T Zellen, welche unter Ruhebedingungen mit Coumarin 6 Mikrokristallen (SUS-C) und mit Coumarin 6 beladenen Liposomen (LIP-C) bzw. SLN (SLN-C) inkubiert wurden; n=6; Mittelwert \pm sd; (Pretor et al. 2014)

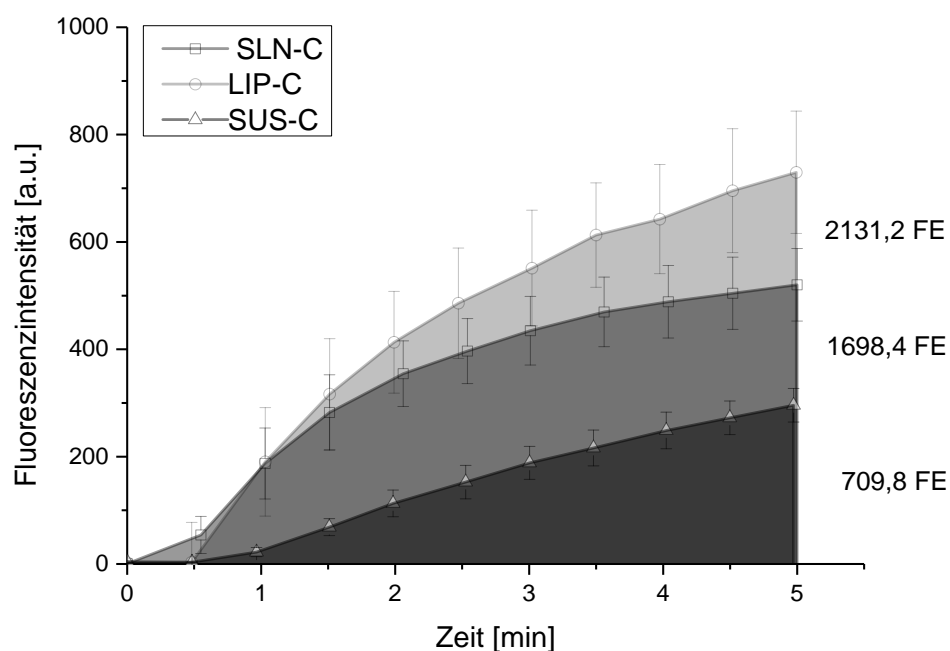


Abb. 4-24: Bestimmung der AUC (area under curve) in Flächeneinheiten (FE) als Korrelation zur insgesamt aufgenommenen Menge an Coumarin 6 während der Inkubation von HCE-T Zellen mit SUS-C (dunkelgraue Fläche), SLN-C (graue Fläche) und LIP-C (hellgraue Fläche) unter Ruhebedingungen.

4.7.2 Fluorimetrie

Um die mittels CLSM unter Ruhebedingungen gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde auf die Fluorimetrie zurückgegriffen. Mit dieser Methode (s. Abschnitt 3.2.8) lassen sich zudem große Stichprobenzahlen bei relativ geringem Reagenzienaufwand untersuchen. Abb. 4-25 zeigt die relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen von HCE-T Zellen nach Inkubation mit Coumarin 6 beladenen SLN (SLN-C) bzw. Liposomen (LIP-C) und Coumarin 6 Mikrokristallen (SUS-C) für einen Zeitraum von 5 bis 30 Minuten. Als Bezugspunkt dienten HCE-T-Zellen, welche ausschließlich mit KRB inkubiert wurden. Ihre Fluoreszenzintensität wurde gleich 0 % gesetzt. Nach 5 Minuten erreichen die Mikrokristalle mit 10 % die geringste Intensitätsänderung, übertroffen von den SLN mit 12 % und den Liposomen mit knapp 25 %. Im weiteren Verlauf konnte bei allen 3 Coumarin 6 Formulierungen ein Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität gemessen werden. Dieser war bei den Mikrokristallen am geringsten, insofern als nach 30 Minuten nur 20 % relative Fluoreszenzintensität erreicht wurden. Im Unterschied dazu wurde mit beladenen SLN und Liposomen eine Intensitätssteigerung nach 30 Minuten auf ca. 35 % (SLN) bzw. mehr als 40 % (Liposomen) erreicht. An jedem der betrachteten Zeitpunkte wurde mit Liposomen die höchste und mit Mikrokristallen die geringste Intensitätssteigerung erreicht. Die Intensitätssteigerung durch SLN lag dazwischen, näherte sich jedoch im Verlauf der Untersuchungen der der Liposomen an. Zum Vergleich wurden die Fluoreszenzintensitätssteigerungen durch Nanoemulsionen aus mittelkettigen Triglyceriden (MCT-C) mit einem Anteil von 0,025 % Coumarin 6 mit aufgenommen. Deutlich erkennbar ist, dass die Intensitätssteigerung mittels SLN um ein Vielfaches höher als die durch Nanoemulsionen hervorgerufene ist. Ein detaillierterer Vergleich der Intensitätssteigerungen bei HCE-T Zellen durch SLN (SLN-C) mit variierender Coumarin 6-Beladung der Lipidmatrix untereinander sowie mit Nanoemulsionen aus mittelkettigen Triglyceriden (MCT-C) ist in Abb. 4-26 dargestellt.

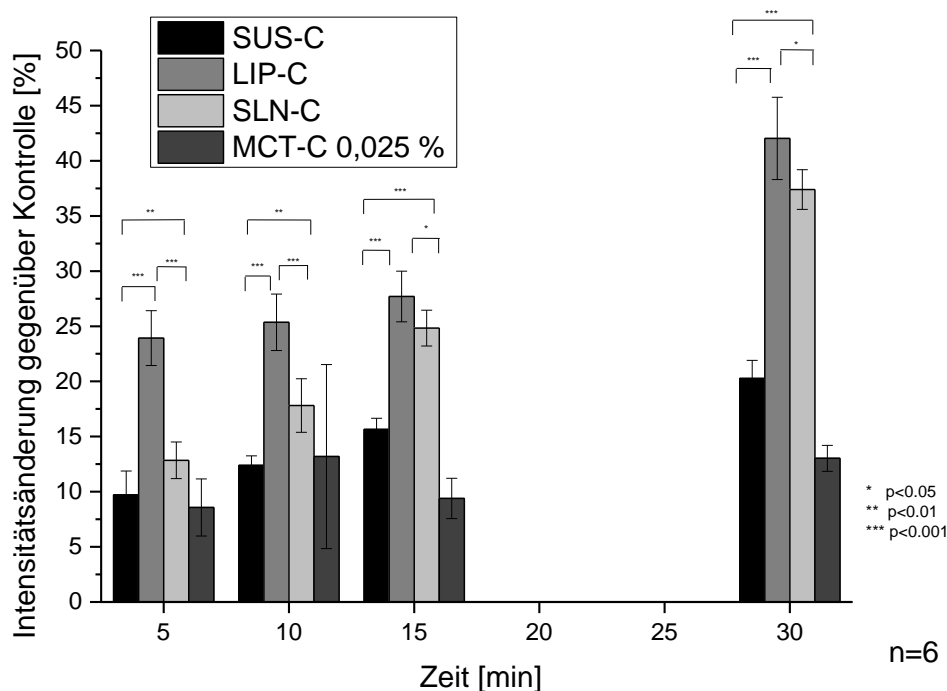


Abb. 4-25: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von HCE-T Zellen gegenüber Kontrolle (Inkubation mit KRB) nach Inkubation mit Coumarin 6 Mikrokristallen (SUS-C), mit Coumarin 6 beladenen Liposomen (LIP-C), SLN (SLN-C) und mit Coumarin 6 beladenen Nanoemulsionen aus Mittelkettigen Triglyceriden (MCT-C) für verschiedene Zeitintervalle (modifiziert nach Pretor et al. 2014)

Im Falle der SLN-Formulierungen nimmt mit steigender Coumarin 6-Beladung der Lipidmatrix die Intensität zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen auf die Kontrolle deutlich zu, im Falle von MCT-C erfolgte diese Zunahme nur in sehr geringem Maß. Der zeitliche Verlauf von 5 bis 30 Minuten Inkubationsdauer zeigt, dass sich die durch die SLN-Formulierungen hervorgerufenen Intensitätsänderungen von 30 %, 45 % und 90 % nach 5 Minuten auf 60 %, 110 % und 170 % nach 30 Minuten nahezu verdoppeln. Die mit 0,025 % Coumarin 6-Anteil beladenen Nanoemulsionen rufen eine über den Zeitverlauf nahezu konstante Intensitätsänderung hervor, während die mit 0,05 % Coumarin 6 beladenen Nanoemulsionen die Fluoreszenzintensität von 15 % nach 5 Minuten auf 30 % nach 30 Minuten steigern. Verglichen mit Abb. 4-25 führen die mit 0,025 % Coumarin 6 beladenen SLN zu einer höheren Intensitätssteigerung. Da eine andere Partikelcharge verwendet wurde, kommt als mögliche Ursache hierfür eine Ungenauigkeit beim Abwiegen der sehr geringen Masse Coumarin 6 in Betracht.

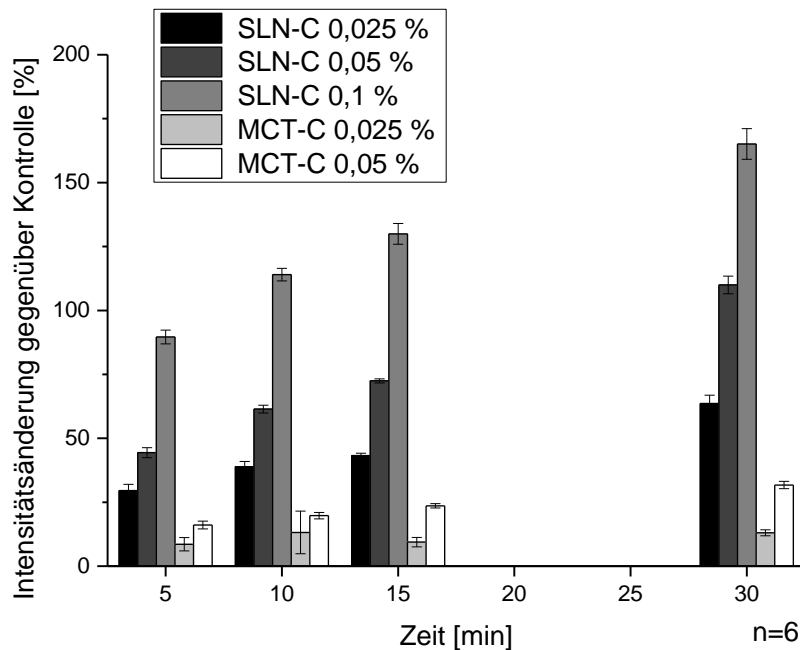


Abb. 4-26: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von HCE-T Zellen gegenüber Kontrolle (Inkubation mit KRB) nach Inkubation mit SLN-Formulierungen und Nanoemulsionen aus Mittelkettigen Triglyceriden (MCT). Die Coumarin 6-Beladung der Formulierungen variiert zwischen 0,025 und 0,1 % (m/m).

Abb. 4-27 zeigt die Ergebnisse einer analogen Untersuchung unter Verwendung von HaCaT-Zellen. Auch hier verursachen mit Coumarin 6 beladene SLN eine deutlich größere Intensitätsänderung als mit Coumarin 6 beladene Nanoemulsionen. Zwar hat ein höherer Farbstoffanteil in den Nanoemulsionen eine höhere Fluoreszenzintensität in den HaCaT-Zellen zur Folge, doch nimmt die Fluoreszenzintensität dieser Zellen bei beiden Nanoemulsionsformulierungen während der Zeitspanne des Experimentes nicht bzw. nur unwesentlich zu. Analog zu HCE-T Zellen steigt im Falle eines wachsenden Anteils an Coumarin 6 in der Lipidmatrix von SLN die Fluoreszenzintensität der HaCaT Zellen. Während die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Falle von SLN-C 0,025 % linear verläuft (im Mittel 1 %-Punkt pro Minute), flacht bei den höheren Coumarin 6 Beladungen die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Untersuchung ab. So konnte zum Zeitpunkt nach 30 Minuten beobachtet werden, dass die SLN-C 0,05 % eine mit SLN-C 0,1 % vergleichbare Fluoreszenzintensität in den HaCaT-Zellen verursachen, was auf eine Sättigung der Zellen mit Coumarin 6 hindeutet.

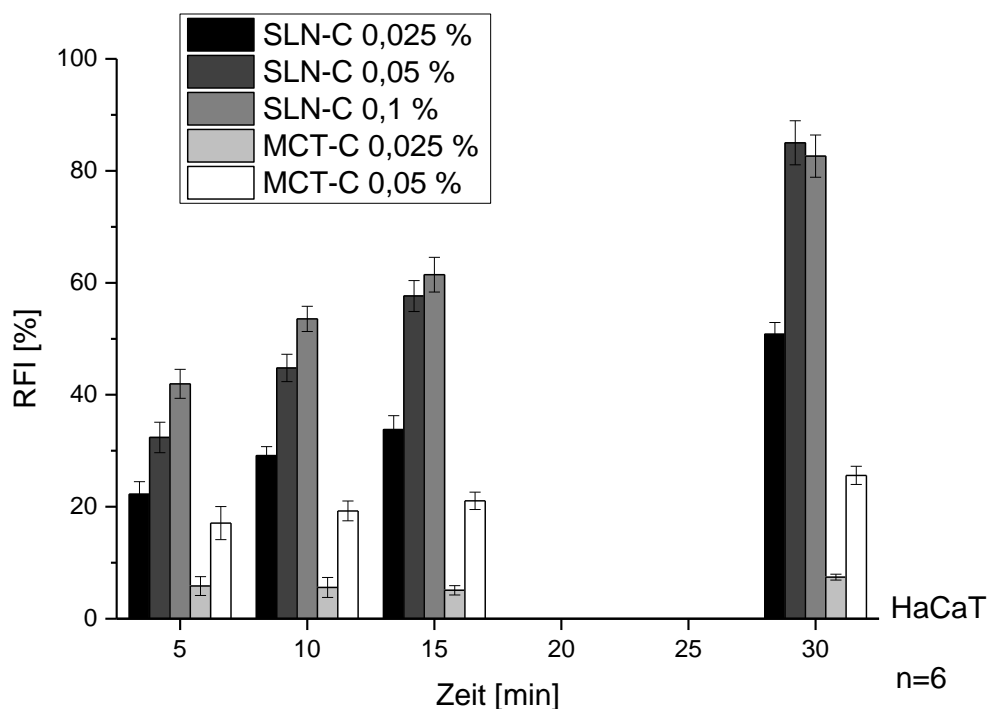


Abb. 4-27: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von HaCaT Zellen nach Inkubation mit SLN-Formulierungen und Nanoemulsionen aus Mittelkettigen Triglyceriden (MCT). Die Coumarin 6-Beladung der Formulierungen variieren zwischen 0,025 und 0,1 % (m/m).

Ein neben der Inkubationszeit, der Art der Formulierung, dem Beladungsgrad und der Zellart weiterer Parameter ist der Modellarzneistoff, dessen Eigenschaften die Übertragung von der Formulierung zu den Zellen bestimmen. Abb. 4-28 zeigt die relative Änderung der Fluoreszenzintensität von HCE-T Zellen nach Inkubation mit Rhodamin B, welches sowohl als SLN-Formulierung als auch als mizellare Lösung mit 1 % Macrogol-15-hydroxystearat für 5 bis 15 Minuten mit den Zellen in Kontakt gebracht wurde. Die durch beide Formulierungen hervorgerufene Intensitätsänderung steigerte sich im zeitlichen Verlauf der Untersuchung kaum. Zwischen den beiden verwendeten Chargen SLN gab es keinen deutlichen Unterschied hinsichtlich Wirkstofflieferung an die Zellen. Deutlich ablesbar ist jedoch, dass das Rhodamin B in mizellarer Lösung eine um 30 Prozentpunkte höhere Intensitätsänderung hervorrief als die SLN-Formulierung. Folglich ist im Sinne einer schnellen und vollständigen Übertragung auf humane Zellen für Rhodamin B eine aufwändige Einarbeitung in feste Lipidnanopartikel weniger effektiv als die einfachere Lösungsvermittlung mittels Emulgator. Im Falle von Coumarin 6 wären die festen Lipidnanopartikel den Nanoemulsionen vorzuziehen, da sie den Modellarzneistoff in größerem Ausmaß auf die Zellen übertragen.

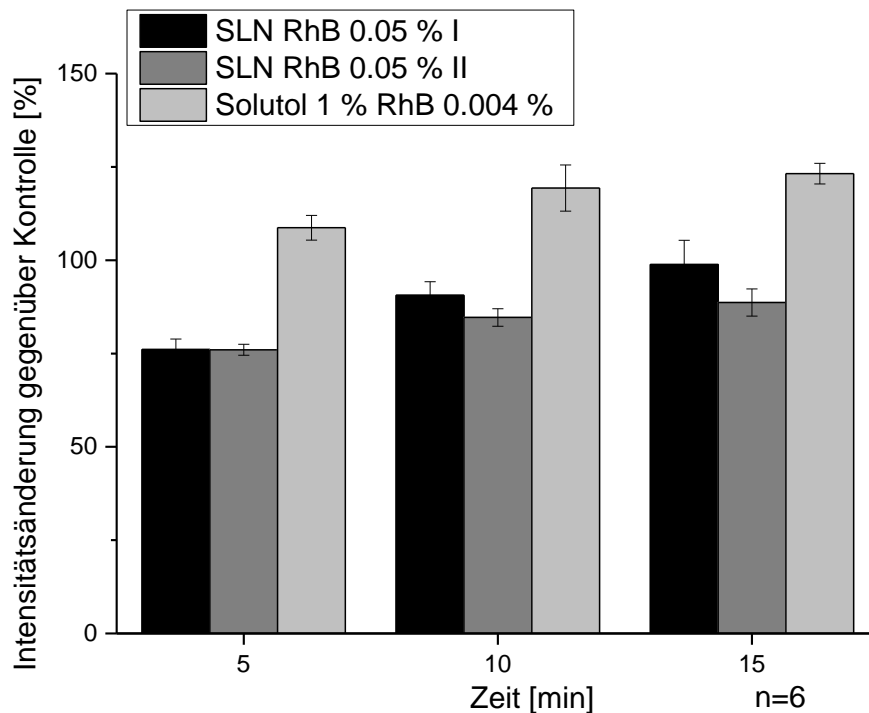


Abb. 4-28: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von HCE-T Zellen nach Inkubation mit 2 verschiedenen Chargen Rhodamin-B beladener SLN und einer mizellaren Lösung von Rhodamin B in 1 % Macrogol-15-hydroxystearat

4.8 Zusammenfassende Diskussion Live Cell Imaging und Fluorimetrie unter statischen Bedingungen

Dass die Übertragung von Coumarin 6 aus Mikrokristallen am langsamsten erfolgt, liegt zunächst an der deutlich geringeren spezifischen Oberfläche. Wäre diese jedoch allein für die niedrige Übertragungsgeschwindigkeit verantwortlich, müsste die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität wesentlich geringer als die der SLN sein, denn eine Vergrößerung des Partikeldurchmessers um den Faktor 100 (10^2) verringert die spezifische Oberfläche, eine kugelförmige Gestalt vorausgesetzt, um den Faktor 1 Million (10^6). Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die Umgebung der Coumarin 6-Moleküle und deren Aggregatzustand. In SLN und Liposomen liegen die Coumarin 6-Moleküle in den lipophilen Bereichen in einem Stoffgemisch gelöst vor, während sie als feste Mikrokristalle in Suspension vorliegen. Eine Freisetzung aus dem Kristallverbund bedingt eine Entropiezunahme, da die Farbstoffmoleküle vom geordneten, festen Zustand in einen weniger geordneten Zustand in der Zellmembran übergehen. Die im Vergleich zu SLN vermehrte

Übertragung von Coumarin 6 aus Liposomen bei ähnlicher Partikelgröße lässt sich mit dem Fehlen einer festen Lipidmatrix bei den Liposomen erklären. Dadurch ist die Fluidität der Lipiddoppelschichten im Vergleich zur Lipidhülle der SLN größer, was eine schnellere Diffusion ermöglicht.

Neben dem Live Cell Imaging kam als weitere Methode die Fluorimetrie zum Einsatz. Die mit beiden Methoden gemessenen Fluoreszenzintensitäten können wegen unterschiedlicher Anregungs-, Detektions- und Verarbeitungsweisen zwar nicht direkt verglichen werden. Dennoch bestätigt die Fluorimetrie das mittels Live Cell Imaging gewonnene Ergebnis in der Tendenz. Das Vermögen, die Fluoreszenzintensität von HCE-T Zellen zu steigern nimmt in der Reihenfolge Mikrokristalle < SLN < Liposomen zu. Die Unterschiede zwischen SLN und Liposomen fallen bei der Fluorimetrie jedoch deutlicher und die zwischen SLN und Mikrokristallen weniger deutlich als beim Live Cell Imaging aus.

Beim Live Cell Imaging erfolgt eine punktförmige Fluoreszenzanregung mittels Laser direkt im fokussierten Bereich innerhalb der Zellen, während die Anregung bei der Fluorimetrie flächig über eine Quecksilberdampflampe mit einigen Millimetern Abstand zu den Zellen erfolgt. Unterschiede in den Messergebnissen beider Methoden sind durch die Unterschiede in der Messtechnik bedingt. Die Empfindlichkeit der Fluorimetrie scheint geringer als beim Live Cell Imaging zu sein. Letzteres zeichnet sich wiederum durch die zeitaufgelöste Darstellung der Fluoreszenzintensität aus, d.h. die Zellen können in variablen Abständen von Millisekunden bis Minuten angeregt und die Fluoreszenz dabei gemessen werden. Aufwändige Waschschrte wie bei der Fluorimetrie entfallen hierbei. Diese bietet jedoch dafür einen schnellen Überblick über die Farbstoffübertragung von verschiedenen Formulierungen und auf verschiedene Zelltypen mit geringem apparativem Aufwand. Es empfiehlt sich somit bei der Formulierungsfindung, zuerst die Fluorimetrie zu nutzen um anschließend mittels Live Cell Imaging eine zeitlich detailliert aufgelöste Übertragungscharakteristik zu erhalten.

Neben den beiden genannten Methoden zur Untersuchung der Aufnahme von Coumarin 6 durch HCE-T Zellen stellt das *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) ein Standardverfahren dar (Gross et al. 2015). Es wurde in dieser Arbeit jedoch nicht angewendet, da die Zellen hierzu vom Boden der Mikrotiterplatte oder des Mikroflussskanals mittels EDTA und Trypsin abgelöst und zusätzlich vereinzelt werden müssen und hierbei besonders im Fall der Mikroflussskanäle ein unvollständiges Ablösen und Vereinzeln der Zellen zu Messfehlern und Fehlinterpretationen führen kann.

Je höher der Anteil an Coumarin 6 in der betrachteten Formulierung ist, umso größer ist die resultierende Fluoreszenzintensitätsänderung, jedoch sind die Änderungen nicht direkt proportional zueinander. Eine Verdopplung des Coumarin 6-Anteils bei SLN führt nicht zu einer Verdopplung der Fluoreszenzintensität, sondern zu geringeren Werten. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte ein gegenseitiges Quenchen der in die Zellmembran übergetretenen Moleküle bei Konzentrationszunahme sein. Besonders deutlich wird dies bei der Inkubation von HaCaT Zellen, welche kleiner als HCE-T Zellen und somit womöglich schneller mit Farbstoff sättigbar sind, sodass Quenchingeffekte früher zum Tragen kommen als bei HCE-T.

Bei der Inkubation mit den Coumarin 6-beladenen Nanoemulsionen scheint ein eventuell vorhandener Quenchingeffekt weniger ausgeprägt zu sein, was mit der geringeren Farbstoffmenge, welche durch diese Formulierungen übertragen wird, begründet werden kann. Dass die Nanoemulsionen weniger Farbstoff übertragen als die SLN, obwohl ihr lipophiler Kern eine höhere Fluidität als der der SLN aufweist, könnte daran liegen, dass das Coumarin 6 eine höhere Affinität zu den Mittelkettigen Triglyceriden besitzt als zur auskristallisierten Lipidmatrix der SLN (Finke et al. 2014).

Im Vergleich der Zellarten fällt auf, dass die Fluoreszenzintensitätsänderungen bei HCE-T Zellen höher ausfallen als bei HaCaT Zellen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Ausgehend von einer Einsaat von 10000 Zellen ergibt sich bei einer Populationsverdopplungszeit von 24 Stunden und einer lag time von 24 Stunden mit anschließender 48-stündiger Wachstumsphase für die im Vergleich zu HCE-T kleineren HaCaT Zellen eine Zellzahl von 40000 pro Well, die somit geringer ist als die 50000 Zellen pro Well der HCE-T (Boukamp et al. 1988; Hahne et al. 2012). In eine höhere Anzahl an Zellen kann sich eine absolut höhere Farbstoffkonzentration umverteilen. Als weiterer Grund können Unterschiede im Zellaufbau eine Rolle spielen, indem verschiedene Zellarten unterschiedlich große lipophile Kompartimente aufweisen, die die Aufnahmekapazität für lipophile Farbstoffe bestimmen. Hierzu zählen auch Unterschiede in der Expression von Proteinen mit lipophilen Bereichen.

Bei der Inkubation von HCE-T Zellen mit Rhodamin B zeigte sich eine stärkere Steigerung der Fluoreszenzintensität unter der Verwendung von Mizellen als von SLN. Dieser Sachverhalt erklärt sich nur zum Teil aus der größeren spezifischen Oberfläche. Obwohl diese durch den Partikelgrößenunterschied von Faktor 10 folglich bei Mizellen 1000fach größer sein sollte als bei SLN, fällt die Intensitätssteigerung nur um 30 Prozentpunkte höher aus.

Auch hierfür könnte ein Quenchingeffekt die Ursache sein, mit der Folge, dass die tatsächlich übertragene Farbstoffmenge wesentlich höher ist als es die relative Intensitätsänderung vermuten lässt. Es scheint sich ein Gleichgewicht zwischen wässrig gelöstem, zellulärem und mizellarem Rhodamin B einzustellen, bei dem der Anteil von letzterem die Menge an zellulär aufgenommenem Rhodamin B scheinbar nur gering beeinflusst. Die Lipidmatrix der SLN könnte hingegen dafür sorgen, dass im Vergleich zu Mizellen weniger Farbstoff in die Zellen dringt. Erklärbar ist dies mit einer unspezifischen Bindung von Rhodamin B an der großen Oberfläche der SLN. Diese Erklärungsansätze hätten jedoch durch weitere Untersuchungen untermauert werden müssen. Hierzu zählen unter anderem die Untersuchung einer rein wässrigen Rhodamin B Lösung sowie die Filtration von Rhodamin B beladenen SLN Formulierungen, um den Anteil der wässrigen äußeren und der lipophilen dispersen Phase an der zellulären Farbstoffübertragung quantifizieren zu können.

4.9 Live Cell Imaging unter Flussbedingungen

4.9.1 Charakterisierung der Strömungsverhältnisse

Die Berechnungen zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse erfolgten am Institut für Mikrotechnik der TU Braunschweig durch Dipl. Ing. Thomas Lorenz.

Zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse in den Mikroflusskanälen erfolgte die Berechnung der Reynolds-Zahl und des Scherstressses bei einer Flussrate von 0,1 mL/min unter Verwendung von reinem Wasser, welches bei 35° C eine Dichte von 994,03 kg/m³ sowie eine dynamische Viskosität von $719,62 \cdot 10^{-6}$ kg/ms besitzt (Aylward und Findlay 1999).

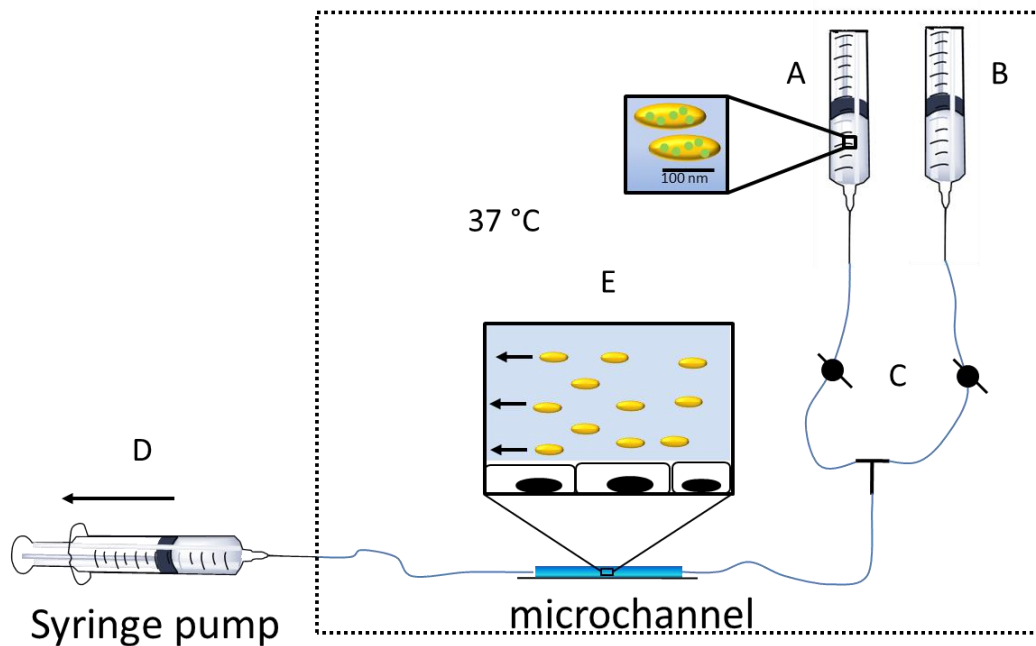


Abb. 4-29: Schematischer Aufbau des verwendeten Mikroflusssystems bestehend aus zwei Mediumreservoiren mit SLN-C (A) und KRB (B), einem Schlauch- und Ventilsystem (C), einer Spritzenpumpe (D) und dem Mikroflussskanal mit HCE-T Zellen (E). Das gestrichelte Quadrat deutet die Wärmekammer des CLSM an, in der das Flusssystem auf einer Umgebungstemperatur von 37 °C gehalten wurde (Pretor et al. 2014).

Bei einer Flussrate von 0,1 mL/min bewegte sich die Flüssigkeit mit einer Geschwindigkeit von $2,78 \cdot 10^{-3}$ m/s durch den Kanal. Der hydraulische Durchmesser des Kanals betrug nach Gl. 3-1 $2,89 \cdot 10^{-4}$ m, woraus sich eine Reynolds-Zahl von 1,11 bei oben genannter Flussrate ergab (s. Gl. 3-2). Damit ist das Strömungsprofil unter den genannten Bedingungen eindeutig laminar. Da sich die Mikroflussskanäle aufweiten, ist die Berechnung der Eintrittslänge sinnvoll um zu bestimmen, ab welchem Punkt nach der Aufweitung dieses laminare Strömungsprofil vollständig ausgebildet ist. Dieser Punkt befindet sich nach Gl. 3-3 lediglich 0,185 mm hinter der vollständigen Aufweitung. Da die Betrachtung der Zellen in den Kanälen ausschließlich im Bereich der vollen Ausdehnung und möglichst in der Kanalmitte erfolgte, ist davon auszugehen, dass in jedem dieser Punkte eine vollständig ausgebildete laminare Flüssigkeitsströmung herrschte. Die Berechnung des Scherstress nach Gl. 3-4 ergab einen Wert von 0,078 Pa bei einer Flussrate von 0,1 mL/min, wobei dies für reines Wasser gilt. Der Betrag des Scherstress wurde auf 0,1 Pa aufgerundet, weil der Zellrasen auf dem Kanalboden die Kanalhöhe verringerte und die höhere Dichte des verwendeten KRB zu einer höheren dynamischen Viskosität führte. Bei Berechnung des Scherstress mit Hilfe von Gl. 2-1 war das Ergebnis identisch, wobei bei Gl. 3-4 die Fließgeschwindigkeit des Mediums (Länge/Zeit) statt der Flussrate (Volumen/Zeit) verwendet wurde.

4.9.2 Modellarzneistoffübertragung durch verschiedene Formulierungen

Im Folgenden wird die Übertragung des Modellarzneistoffes Coumarin 6 aus Mikrokristallen und zwei nanoskaligen Arzneistoffträgerformulierungen auf HCE-T Zellen unter definierten Flussbedingungen dargestellt, indem die Entwicklung der intrazellulären (schwarze Kurven) und der extrazellulären (rote Kurven) Fluoreszenzintensität über die Zeit aufgetragen wurde. Die zusätzlichen blauen Kurven bilden die Differenz beider Fluoreszenzintensitäten ab und stellen die Netto-Aufnahmerate des Farbstoffes in die Zellen dar, die hinsichtlich der Effektivität der Coumarin 6 Übertragung aus den einzelnen Formulierungen verglichen werden kann. Die grau unterlegten Felder kennzeichnen die 5-minütige Umspülung mit einer Mischung aus KRB und Formulierung.

Die folgenden Diagramme stehen exemplarisch für zwei Versuche mit jeweils der gleichen Formulierung, wobei streng auf die Einhaltung gleicher Geräteeinstellungen am CLSM geachtet wurde. Der Intensitätsverlauf bei der Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6 Mikrokristallen ist in Abb. 4-30 dargestellt. Die extrazelluläre Fluoreszenzintensität blieb nahezu konstant auf einem Niveau von 100 a.u., somit waren intrazelluläre Fluoreszenzintensität und Intensitätsdifferenz zueinander parallel verschoben. Grund hierfür ist einerseits die im Vergleich zu SLN und Liposomen geringe Teilchenmenge, in deren Folge die Wahrscheinlichkeit der fluoreszenzmikroskopischen Detektion eines oder mehrerer Mikrokristalle sehr gering ist. Andererseits ordnen sich Coumarin 6 Moleküle im Mikrokristall parallel zueinander an, wodurch die Intensität ihrer Fluoreszenz zusätzlich sinkt (Banerjee et al. 2016). Bei jeder der insgesamt drei Umspülungen mit Mikrokristallen (graue Felder) erhöhte sich die intrazelluläre Fluoreszenzintensität um durchschnittlich ca. 75 a.u., sodass sich in der Differenz eine maximale Fluoreszenzintensität von 240 a.u. ergab. Die Umspülung mit KRB resultierte in zwei Plateaus zwischen den drei Formulierungsumspülungen (15-20 und 25-30 min), bei denen keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden konnte. Während der letzten Umspülung mit KRB nahm die intrazelluläre Fluoreszenzintensität hingegen wieder deutlich vom Maximalwert auf ca. 200 a.u. ab.

Aus dieser schrittweisen Intensitätszunahme lässt sich ableiten, dass die zelluläre Kapazität zur Aufnahme von Coumarin 6 nach der ersten Umspülung noch nicht gesättigt ist. Da die Fluoreszenzintensität während der Umspülungen mit reinem KRB konstant blieb, scheint der Modellarzneistoff relativ photostabil zu sein und nur wenig auszubleichen. Eine Ausnahme

bildet hier der Zeitraum von 35 bis 40 min. Eine Erklärung für die Abnahme der Fluoreszenzintensität könnte Self-Quenching der Coumarin 6 Moleküle sein, für das die erforderliche Konzentration erst ab der dritten Umspülung mit Formulierung erreicht wurde. Eine andere Möglichkeit wäre die beginnende Photolyse des Coumarin 6 nach 30-minütiger Anregung, wobei zuerst die Moleküle destabilisiert werden, welche sich während der ersten Umspülung mit Formulierung in den Zellen angereichert haben. Eine dritte Erklärung wäre die lysosomale Unterdrückung der Coumarin 6 Fluoreszenz, da in Lysosomen ein saurer pH-Wert herrscht, wodurch Fluoreszenzeigenschaften reversibel aufgehoben werden (Finke et al. 2014).

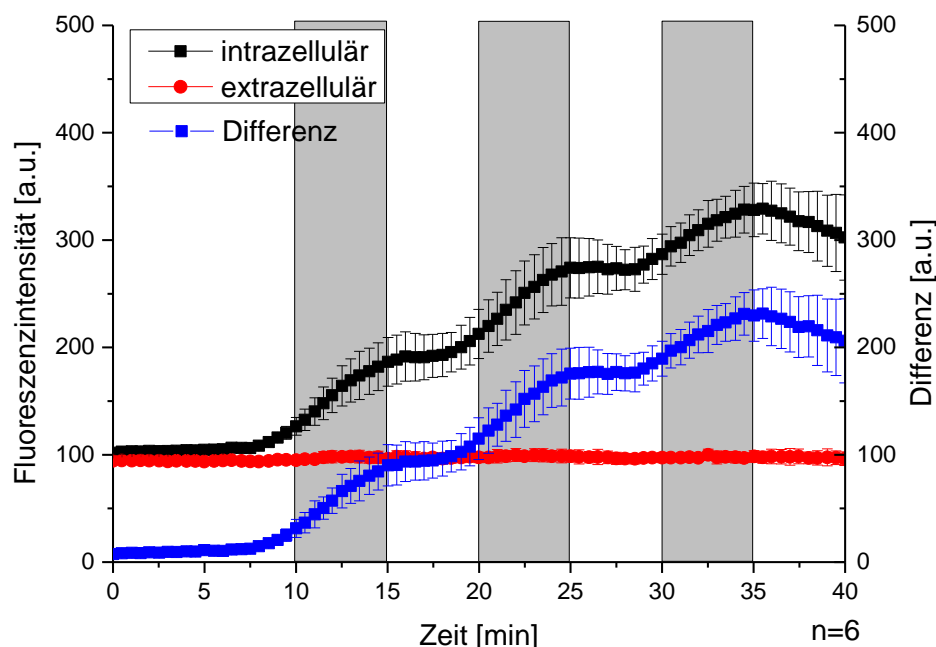


Abb. 4-30: Verlauf der intrazellulären (schwarz) und extrazellulären (rot) Fluoreszenzintensität von HCE-T Zellen im Mikroflussskanal, welche abwechselnd mit KRB und Coumarin 6 Mikrokristallen umspült wurden. Die blaue Kurve zeigt auf der rechten Ordinate die Differenz zwischen intra- und extrazellulärer Fluoreszenzintensität an.

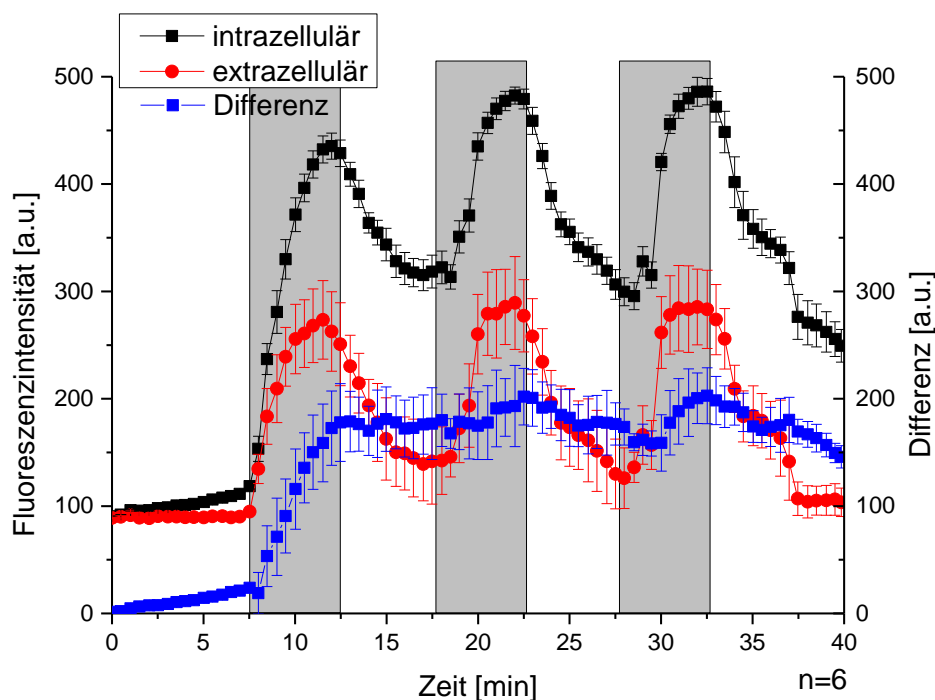


Abb. 4-31: Verlauf der intra- und extrazellulären Fluoreszenzintensität von HCE-T Zellen, welche mit Coumarin 6-beladenen Liposomen und KRB umspült wurden

Abb. 4-31 zeigt die Intensitätsverläufe für die Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6 beladenen Liposomen. Mit Beginn der ersten Liposomenumspülung stieg die extrazelluläre Fluoreszenzintensität auf ca. 275 a.u. an, der Anstieg der intrazellulären Fluoreszenzintensität erfolgte zeitgleich bis auf ca. 450 a.u. Die Verläufe von intra- und extrazellulärer Fluoreszenzintensität waren nahezu parallelverschoben, daher verläuft die Intensitätsdifferenz nach der ersten Liposomenumspülung auf einem Niveau von ca. 200 a.u., von einigen Schwankungen abgesehen, nahezu parallel zur Abszisse. Nach der ersten Liposomenumspülung stellte sich nach 12,5 min unter KRB-Umspülung ein Plateau der Intensitätsdifferenz ein. Auch in diesem Fall blieb das Coumarin 6 in den Zellen angereichert. Eine weitere Liposomenumspülung erhöhte diese nur geringfügig um danach wieder auf das vorherige Niveau abzufallen. Eine vollständige Aufsättigung der Zellen mit dem Modellarzneistoff hatte in diesem Fall schon mit der ersten Formulierungsumspülung stattgefunden. Nach 22,5 min nahm die Intensitätsdifferenz leicht ab, was auf beginnenden lysosomalen Abbau des Farbstoffes oder eine beginnende Photolyse hindeutet. Self-Quenching kann ausgeschlossen werden, weil die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits ein Maximum an Coumarin 6 aufgenommen haben und die Intensitätsdifferenz bei der dritten Liposomenumspülung erneut wieder auf 200 a.u. zunahm. Es ist demnach eher davon

auszugehen, dass durch Abbau und anschließende Umverteilung einer geringen Menge des Coumarin 6 in die wässrige Umgebung Kapazitäten für die Anreicherung neuer Moleküle aus den Liposomen frei geworden sind. Mit Beginn der letzten Umspülung mit KRB nach 32,5 min begann ebenfalls ein Rückgang der Intensitätsdifferenz, dessen Ausmaß dem vorigen entsprach.

Die Umspülung mit Coumarin 6-beladenen SLN ergab, wie Abb. 4-32 zeigt, im Vergleich zu den Liposomen ein ähnliches Bild. Auch hier war bereits nach der ersten Umspülung mit Formulierung nach 12,5 min die maximale intrazelluläre Fluoreszenzintensität von 225 a.u. erreicht. Die Differenzkurve besaß einen Maximalwert von 130 a.u. eine im Vergleich zu Liposomen 25 % niedrigere Intensitätsdifferenz. SLN scheinen trotz gleicher Beladungsmenge weniger Coumarin 6 an die Zellen liefern zu können. Weil die extrazelluläre Fluoreszenzintensität trotz der Wechsel zwischen SLN und KRB nur um Werte von ca. 20 a.u. schwankte, waren intrazelluläre Fluoreszenzintensität und Intensitätsdifferenz nahezu parallel verschoben. Bei jeder Umspülung mit KRB nahmen die Werte der Intensitätsdifferenz um mindestens 20 a.u. ab, allerdings auch hier am stärksten beim vorletzten und letzten Spülschritt mit KRB (beginnend bei 22,5 bzw. 32,5 min). Die Schwankungen der extrazellulären Fluoreszenz nehmen in der Reihenfolge SUS-C < SLN-C < LIP-C zu. Neben dem Aspekt der geringen Teilchenzahl im Falle von SUS-C (s. oben) kann dies auch mit der im Vergleich zur SLN-Dispersion geringeren Trübung der Liposomendispersion erklärt werden. Diese hat zur Folge, dass das bei Anregung emittierte Fluoreszenzlicht auf seinem Weg zum Detektor weniger stark gebrochen wird, wodurch eine höhere extrazelluläre Fluoreszenzintensität resultiert.

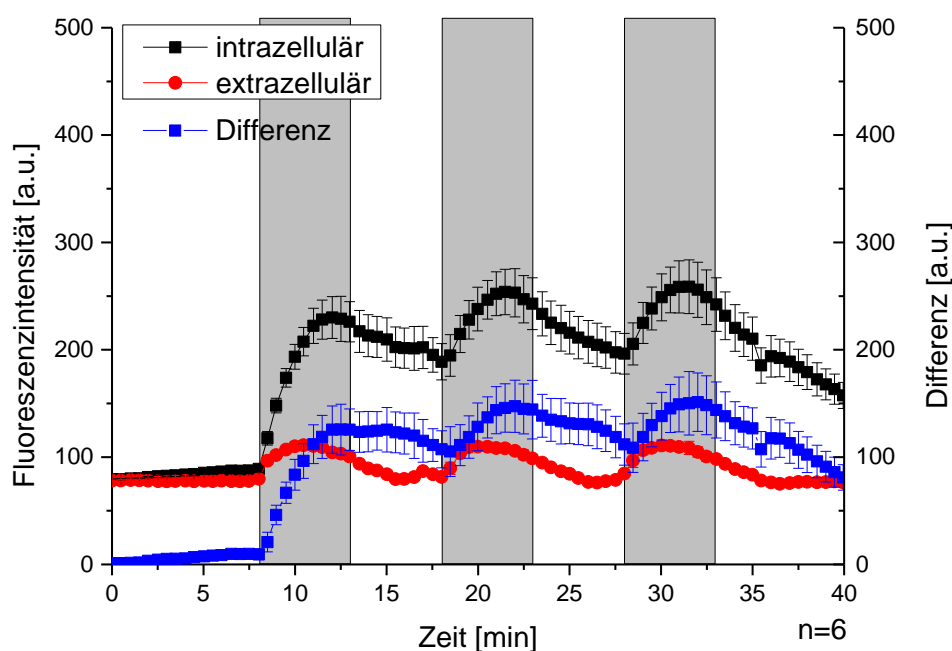


Abb. 4-32: Verlauf der intra- und extrazellulären Fluoreszenzintensität von HCE-T Zellen, welche mit Coumarin 6-beladenen SLN und KRB umspült wurden

4.9.3 Kinetische Aspekte der Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen SLN und Liposomen

Der Verlauf der Intensitätskurven in Abb. 4-32 zeigt eine starke Ähnlichkeit zum Verlauf des Konzentrations-Zeit-Profiles eines Arzneistoffes (ln-Konzentration gegen Zeit) nach peroraler Applikation. Arzneistoffabsorption und Arzneistoffelimination laufen hierbei parallel zueinander ab und bestimmen den charakteristischen Verlauf der Plasmaspiegelkurve (sog. Bateman-Funktion). Die Bestimmung der jeweiligen Absorptions- und Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgt nach dem Abschälverfahren (Abb. 4-33). Hierbei wird davon ausgegangen, dass ab dem Wendepunkt der Plasmaspiegelkurve ausschließlich Elimination vorliegt und die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_e aus der Steigung der resultierenden Ausgleichsgerade (s. Abb. 4-33, rote Datenpunkte) bestimmt werden kann. Statt der Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenzintensitätsdifferenz (blaue Kurve in Abb. 4-32) logarithmiert aufgetragen. Die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante k_a wird nach Extrapolation der Ausgleichsgerade zur Bestimmung von k_e ermittelt, indem von deren entlogarithmierten Werten (s. Abb. 4-33, grüne Punkte) die entlogarithmierten Werte der Plasmaspiegelkurve subtrahiert werden. Diese

Differenz, erneut logarithmiert und aufgetragen (s. Abb. 4-33 schwarze Punkte) ergibt in Form der Steigung ihrer Ausgleichsgerade die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante k_a . Für die erste Umspülung der HCE-T Zellen mit SLN-C (s. Abb. 4-32, erster grauer Balken von links) ergab sich somit eine Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von ca. $0,052 \text{ min}^{-1}$ und eine Absorptionsgeschwindigkeitskonstante von ca. $0,504 \text{ min}^{-1}$. Somit flutet Coumarin 6 fast zehnmal schneller in den Zellen an als es aus diesen wieder eliminiert wird. Die Halbwertszeit des Coumarin 6 in HCE-T Zellen wurde mit der Gleichung $t_{1/2} = \ln 2/k_e$ bestimmt und betrug ca. 13 Minuten.

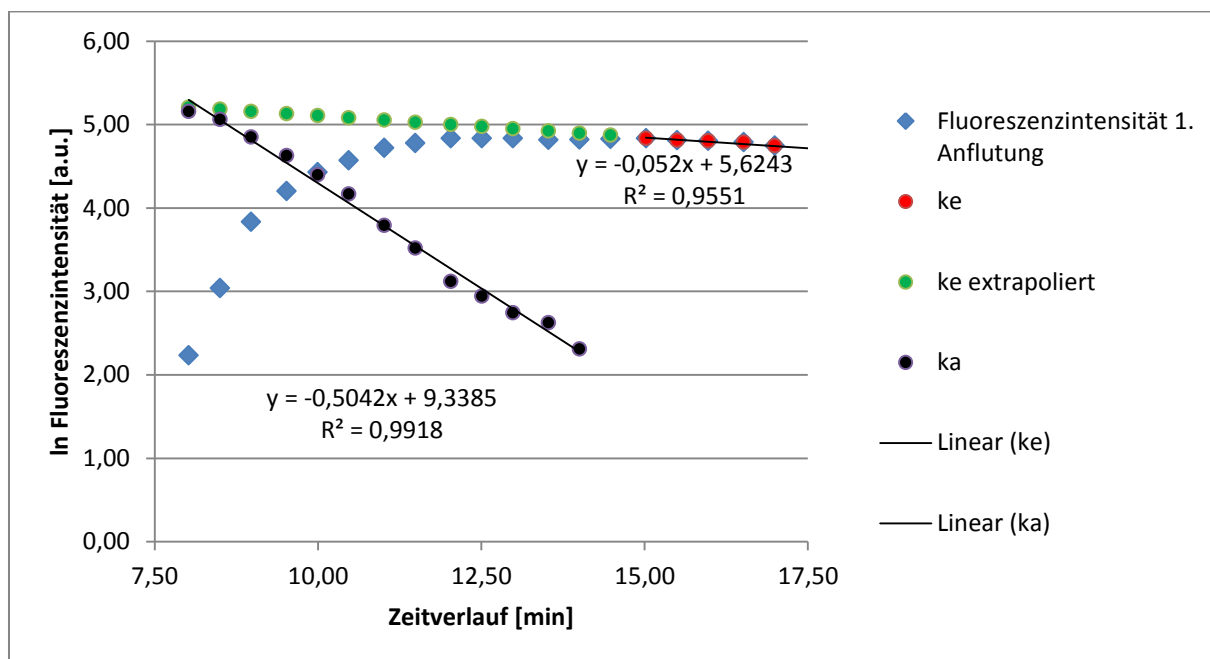


Abb. 4-33: Aus Abb. 4-32 nach dem Abschälverfahren hergeleitete Aufnahme- und Eliminationskinetiken für nanopartikuläres Coumarin 6 aus der 1. Anflutung (s. Abb. 4-32 erster grauer Balken von links). Die hierüber bestimmte Eliminationsgeschwindigkeitskonstante betrug ca. $0,052 \text{ min}^{-1}$, die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante $0,504 \text{ min}^{-1}$. Die aus k_e berechnete Eliminationshalbwertszeit betrug ungefähr 13 Minuten.

Durch die wiederholte Anwendung dieses Verfahrens auf jede der drei Umspülungsphasen für jeweils drei verschiedene Flussexperimente konnten Mittelwerte für Absorptions- und Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten der Übertragung von Coumarin 6 durch SLN auf HCE-T Zellen näherungsweise abgeleitet werden (s. Anhang Diagramme Abb. 8-33, Abb. 8-34 und Abb. 8-35). Tabelle 4-3 fasst die hierbei bestimmten Werte zusammen. K_a ist demnach immer mindestens zehnmal größer als k_e . Die Abweichungen zwischen den Werten der drei Experimente sind beim ersten Anfluten mit einer relativen Standardabweichung von 15 bzw. 21 % moderat. Beim 2. und 3. Anfluten der SLN-C nimmt die Absorptionskonstante stets, die Eliminationskonstante in den meisten Fällen zu. Gleiches gilt für die relative Standardabweichung beider Werte, welche bis auf 36 % ansteigt.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Absorptions- und Eliminationskonstanten (k_a bzw. k_e) für die Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen SLN im Mikroflussskanal bei 0,1 Pa

	1. An- und Abfluten		2. An- und Abfluten		3. An- und Abfluten	
	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]
Exp. Nr. 1	0,5042	0,0520	1,0712	0,0396	0,8379	0,0751
Exp. Nr. 2	0,6804	0,0660	0,9867	0,0844	1,5310	0,0959
Exp. Nr. 3	0,5739	0,0440	0,7619	0,0774	0,9807	0,0814
MW	0,5862	0,0540	0,9399	0,0671	1,1165	0,0841
sd	0,0887	0,0111	0,1599	0,0241	0,3660	0,0107
sd rel [%]	15	21	17	36	33	13

Da sich aus dem Verlauf der Differenzkurve bei der Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen Liposomen zwischen den Mediumwechseln kaum deutliche Zu- und Abnahmen der Fluoreszenzintensität ergaben (s. Abb. 4-31, blaue Kurve), erfolgte die Bestimmung der Absorptions- und Eliminationskonstanten jeweils aus dem Verlauf der Kurven für die intra- und die extrazelluläre Fluoreszenzintensität (s. Abb. 4-31, rote und schwarze Kurve). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der Absorptions- und Eliminationskonstanten (k_a bzw. k_e) für die Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen Liposomen im Mikroflussskanal bei 0,1 Pa aus zwei Experimenten

	1. An- und Abfluten		2. An- und Abfluten		3. An- und Abfluten	
intrazellulär	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]	k_a [min ⁻¹]	k_e [min ⁻¹]
Exp. Nr. 1	1,0166	0,0667	0,7075	0,0830	1,1105	0,0911
Exp. Nr. 2	0,8858	0,1197	0,6221	0,1860	1,1300	0,0983
extrazellulär						
Exp. Nr. 1	1,1606	0,1361	0,7839	0,1396	0,9878	0,1490
Exp. Nr. 2	0,9223	0,2335	0,6500	0,3191	2,0419	0,1448

Beim ersten Anfluten zeigen intra- und extrazelluläre Werte beider Experimente für k_a eine deutliche Ähnlichkeit, was durch den parallelen Verlauf beider Intensitätskurven zustande kommt. Dies bedeutet, dass Coumarin 6 mit dem Erscheinen der ersten Liposomen sofort in die Zellen eindringt. Die intra- und extrazellulär bestimmten Werte für k_e zeigen sich indes sowohl beim ersten als auch beim zweiten Abfluten um den Faktor 2 verschieden voneinander

und nähern sich erst beim dritten Abfluten einander wieder an. Mit einer Ausnahme ähneln sich die Werte für intra- und extrazellulär bestimmtes k_a beim zweiten und dritten Anfluten. Lediglich beim 3. Anfluten in Experiment Nr. 2 unterscheiden sich beide ungefähr um den Faktor 2.

Mit Hilfe des Abschälverfahrens lassen sich die experimentell gewonnenen Ergebnisse quantifizieren, sodass sowohl die verwendeten Arzneiformen als auch die Flusseexperimente untereinander vergleichbar werden. Hierüber bestünde ebenfalls die Möglichkeit, Validierungsansätze für das vorgestellte Flusssystem zu entwickeln.

4.9.4 Einfluss der Flusseexperimente auf die Viabilität von HCE-T Zellen

Die Anwendung eines mikrofluidischen Systems zur Untersuchung der Modellarzneistoffübertragung auf humane Zellen unter Flussbedingungen setzt voraus, dass die Zellen im System intakt bleiben. In Tabelle 4-5 sind die hierzu untersuchten Parameter zusammengestellt. Die Bestimmung der Viabilität lebender Zellen über deren Zellmembranintegrität bei Inkubation mit geeigneten Farbstoffen vor den jeweiligen Versuchen ergab Werte von annähernd 100 % (Tabelle 4-5, Spalte 1). Dies bedeutet, dass die Untersuchung der Farbstoff- bzw. Partikelaufnahme durchführbar ist.

Tabelle 4-5: Prozentsatz lebender Zellen (vgl. Abschnitt 3.2.6, Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid) vor und nach dem Live Cell Imaging (LCI) unter Flussbedingungen; Mittelwert \pm sd; n=3

Formulierung	Anteil lebender Zellen vor LCI (Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung) [%]	Anteil lebender Zellen nach LCI (Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung) [%]	Anteil anhaftender Zellen (Hoechst 33342-Färbung) [%]
SUS-C	98 \pm 3	96 \pm 2	99 \pm 1
LIP-C	98 \pm 2	87 \pm 11	92 \pm 3
SLN-C	100 \pm 0	88 \pm 8	94 \pm 11

Nach den jeweiligen Flusseexperimenten nahm die Membranintegrität in der Reihenfolge SUS-C > SLN-C > LIP-C ab (Tabelle 4-5, Spalte 2). Die farbstoffbeladenen nanoskaligen Arzneistoffträger schädigten die Zellmembranen unter Flussbedingungen somit mehr als der

mikrokristalline Farbstoff allein. Der Anteil nach dem Versuch geschädigter Zellen ist mit etwas mehr als 10 % Abnahme dennoch akzeptabel. Die Zellen wurden während der jeweiligen Versuche zusätzlich permanent mikroskopisch auf das Auftreten von Rupturen überprüft. Da solche nicht auftraten, ist der Verlust an Membranintegrität eher auf Apoptose einzelner Zellen zurückzuführen.

Da die Zellen im Laufe eines Flussexperiments nicht nur Membranschäden erleiden, sondern sich auch von der Wachstums Oberfläche ablösen können, wurde zusätzlich der Anteil nach jedem Versuch noch anhaftender Zellen bestimmt. Dieser betrug für alle drei untersuchten Formulierungen über 90 % (Tabelle 4-5, Spalte 3). Die wenigsten Zellen lösten sich bei Umspülung mit Coumarin 6 Mikrokristallen (SUS-C), die meisten bei der Umspülung mit Liposomen, wobei die größte Standardabweichung bei SLN auftritt, weil sich in einem Fall überdurchschnittlich viele Zellen gelöst hatten. Dies lässt sich mit einer unvollständigen Polylysin-Beschichtung des Kanalbodens erklären, was zu einem vermehrten Ablösen geführt hat.

4.10 Zusammenfassende Diskussion Live Cell Imaging unter Flussbedingungen und Anwendbarkeit des verwendeten Mikrosystems

Das Ziel einer abwechselnden Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6 haltigen Formulierungen und KRB war, die dynamischen Verhältnisse einer Arzneistoffapplikation am Auge *in vitro* nachzustellen. Ein großer Vorteil des verwendeten Mikrosystems im Vergleich zu Mikrotiterplatten und zum FACS ist, dass die Effekte eines Auswaschschrittes und einer erneuten Wirkstoffapplikation auf die zelluläre Wirkstoffaufnahme untersucht werden können (sog. dynamische Donator-Akzeptor-Führung).

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten muss jedoch sichergestellt sein, dass das Mikroskopobjektiv stets auf die gleiche Zellebene fokussiert wird und während des Versuchs dort fokussiert bleibt. Aus diesem Grund muss auch der Mikroflusskanal während des gesamten Versuchs waagrecht auf dem Objektisch angebracht sein. Zudem müssen die Einstellungen der mikroskopischen Laser- und Detektoranordnung stets gleich sein. So führen Änderungen in der Anregungsintensität, der Pinholegröße und der Signalverstärkung am Detektor zu unterschiedlichen Intensitätswerten. Durch die zeitaufwändige Vorbehandlung der Kanäle und die Anzahl an Apparaturen sind Flussexperimente der vorgestellten Art relativ

komplex und zum Wirkstoff- und Formulierungsscreening nur begrenzt geeignet. Letzteres wird üblicherweise mit Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei nach erfolgter Eingrenzung der Wirkstoffe und Formulierungen auf weniger als zehn Kandidaten der Einsatz des Mikroflusssystems zu empfehlen ist.

Die Anordnung der Komponenten wurde bewusst so gewählt, dass das Medium von der Spritzenpumpe durch den Mikroflusskanal aus dem Reservoir gesaugt wurde. Erstens vereinfacht sich hierdurch der Wechsel zwischen verschiedenen Medien während des Versuches. Zweitens reduziert diese Anordnung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Luftblasen im Mikroflusskanal. Diese bilden sich bevorzugt im nach oben geöffneten Mediumreservoir, können dort aber durch Aufstieg nach oben leicht entfernt werden, bevor sie in den Mikroflusskanal gelangen.

Über den Scherstress und die wiederholten Auswaschschritte mit KRB sollte der Einfluss von Lidschlag und Tränenfluss auf die okuläre Arzneistoffapplikation abgeschätzt werden. Wird das Auge durch die Applikation eines Arzneistoffes gereizt, können bis zu 50 μL Tränenflüssigkeit pro Minute sezerniert werden (Kircher 2015). Aus diesem Grund wurde im Mikrosystem eine Umströmungsrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt um *worst case* Bedingungen zu simulieren. Der daraus resultierende Scherstress von 0,1 Pa stellt ein für die Zellen verträgliches Maß dar. Es existieren Arbeiten zur Untersuchung der Oberflächenhaftung von HCE-T Zellen, in denen bis zu 10 Pa verwendet wurden (Karuri et al. 2006).

Im Gegensatz zum Scherstress in Blutgefäßen, welcher in Arterien beim Menschen zwischen 0,5 und 1,3 Pa beträgt (Reneman und Hoeks 2008), ist zum Scherstress am Auge nur wenig bekannt. Man darf annehmen, dass dieser deutlich über dem in den Blutgefäßen liegt, da zusätzlich zum Tränenfluss der Lidschlag berücksichtigt werden muss, welcher eine Scherrate von 10^4 s^{-1} erzeugt (Bother et al. 1990). Unter Anwendung von Gl. 2-2 und der Annahme, die Viskosität der Tränenflüssigkeit entspräche der von Wasser, wäre somit ein Scherstress von bis zu 10 Pa vorherrschend. Aufgrund kolloidaler Bestandteile des Tränenfilms wie gelöster Mucine besitzt die Tränenflüssigkeit jedoch eine bis zu zehnfach höhere Viskosität als Wasser und zeigt pseudoplastisches Fließverhalten, d.h. die Viskosität nimmt mit steigendem Scherstress ab, sodass zum Beginn eines Lidschlags ein deutlich höherer Scherstress herrscht (Tiffany 1991). Dieser wird *in vivo* jedoch durch die Ausbildung einer Mucinschicht und vor allem durch den mehrschichtigen Aufbau des Corneaepithels toleriert. *In vitro* fehlen im Flusssystem die entsprechende Basalmembran und die multiplen Zellschichten, sodass nur ein weitaus geringerer Scherstress tolerierbar sein sollte.

Die Bewegung des Augenlids ist mit seinen Ab- und Aufwärtshüben relativ komplex und beinhaltet auch Änderungen der Höhe des Tränenfilms und der Lipidkonzentrationen während der Bewegung (Braun et al. 2015). Das Mikroflusssystem um diese Details zu erweitern könnte Bestandteil von Folgearbeiten sein. Die Umströmungszeit wurde mit fünf Minuten pro Formulierung so angepasst, dass die Zellen mit jeweils 500 μL an Formulierung bzw. Puffer umspült wurden und somit eine Korrelation zum verwendeten Volumen beim Live Cell Imaging unter Ruhebedingungen (vgl. Abschnitt 4.7.1) bestand. Durch das Totvolumen von 0,5 mL in den Schläuchen des Mikroflusssystems fand ein partielles Mischen der Partikeldispersion mit dem Puffer statt, sodass die roten Kurven beim Wechsel des Mediums keine sprunghafte Intensitätsanpassung zeigten.

Um einer Sedimentation der Coumarin 6 Mikrokristalle vorzubeugen, wurde während jedes Versuchs alle zehn Minuten durch Einspritzen von Luft mit Hilfe einer 10 mL Spritze im Dispersionsreservoir Konvektion erzeugt, um die Homogenität der Dispersionen sicherzustellen. Materialart und -stärke des Kanalbodens wurden entsprechend gewählt, um mit den 24-Well-Mikrotiterplatten aus Abschnitt 3.2.7.1 vergleichbar zu sein. Dies hatte zwei Gründe, die im Wesentlichen auf der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Ruhe- und Flussbedingungen abzielten: Erstens wuchsen die HCE-T Zellen auf jeweils gleichem Material. Zweitens war eine Wechselwirkung zwischen Arzneistoffträgern und polyelektrolytbeschichteter Oberfläche aus Vorgängerarbeiten bekannt (Finke et al. 2013). Da auch Polylysin ebenso wie die dort eingesetzten Polyelektrolyte positiv geladen ist, kann von einer partiellen Adsorption von SLN und Liposomen an das hiermit behandelte Glas ausgegangen werden. Durch Verwendung gleicher Materialien bei den Untersuchungen unter Ruhe- und unter Flussbedingungen dürften hierdurch verursachte Fehler vernachlässigbar erscheinen. Die Verwendung künstlicher Tränenpräparate im System wäre möglich, setzt jedoch die Prüfung der Stabilität der Formulierungen in den Zellkultur-Medien voraus, da letztere neben Puffersubstanzen geladene Makromoleküle wie Hyaluronsäure enthalten.

Die maximalen Fluoreszenzintensitäten nach fünfminütiger Umspülung mit den jeweiligen Formulierungen zeigen, dass die Übertragungsgeschwindigkeit des Coumarin 6 auf die Zellen ebenso wie unter Ruhebedingungen in der Reihenfolge LIP-C > SLN-C > SUS-C abnimmt. Die Gründe hierfür sind die gleichen, welche in Abschnitt 4.8 genannt wurden. Der Mediumfluss scheint keinen negativen Einfluss auf die Farbstoffübertragung zu haben. Damit wird noch einmal die dominierende Rolle der Diffusion vor dem Kontakt der Partikel mit den Zellen unterstrichen. Die stufenförmig verlaufende Aufsättigung der Zellen mit Coumarin 6

im Falle der Mikrokristalle zeigt besonders mit ihren Plateaus, dass es den Zellen möglich ist das Coumarin 6 trotz KRB-Umspülung zu speichern. Zudem wird anhand der erhaltenen Intensitätsplateaus die Photostabilität des Coumarin 6 während der KRB-Umspülung demonstriert (Pajk 2014). Dass die Intensität im letzten KRB-Umspülungsintervall dennoch abnimmt, könnte mit dem Phänomen des Selbstquenchens nach Überschreiten einer kritischen Farbstoffkonzentration erklärt werden.

Bei der Bestimmung der Absorptions- und Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten k_a bzw. k_e konnte mittels numerischer Daten gezeigt werden, dass sich das Coumarin 6 als lipophiler Farbstoff in den Zellen einlagert und mit zehnfach verringerter Geschwindigkeit aus ihnen herausdringt. Die für SLN-C ermittelten Werte zeigen, dass zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte Experimente durchaus vergleichbare Ergebnisse liefern. Dass k_a ab dem zweiten Anfluten zunimmt und stärker schwankt könnte ein Hinweis auf eine sich im Verlauf des Versuches verstärkende Durchlässigkeit der Zellmembran sein, was im Einklang mit den Ergebnissen der Zellfärbeversuche in Tabelle 4-5 steht. Dass k_e ebenfalls zunimmt stützt diese Erklärung, da ein größerer Anteil an Farbstoff nach Kontakt mit den Zellen bzw. Durchdringung der Membran beim Spülen mit Puffer auch wieder in entsprechenden Anteilen entfernt wird. Die für die Umspülung mit LIP-C bestimmten Werte für k_a fallen beim ersten Anfluten größer als bei SLN-C aus und bestätigen, dass Coumarin 6 aus Liposomen schneller und in größerem Ausmaß an die HCE-T übertragen wird als mittels SLN. Im Falle von LIP-C unterscheiden sich k_a und k_e insofern voneinander, als dass k_a zwischen zwei- und zehnmal größer als k_e ausfällt. Es scheint dass Coumarin 6 hier im Vergleich zu SLN-C scheinbar schneller, aber auch deutlich weniger reproduzierbar auf die Zellen übertragen bzw. aus ihnen entfernt wird. Auch hier könnte eine im Verlauf des Versuches zunehmende Membranporosität eine Rolle spielen.

Obwohl sich die Bestimmung der Absorptions- und Eliminationsgeschwindigkeitskonstante gut für eine spätere Validierung des Flusssystems eignet, muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass die Auswertung auf dem idealen Verlauf einer Plasmaspiegelkurve bei peroraler Arzneistoffapplikation beruht. Hierbei spielen Faktoren wie die gastrointestinale Resorption, die Verteilung des Arzneistoffes durch den Blutkreislauf und seine zeitgleich stattfindende Elimination, welche hauptsächlich in der Leber stattfindet, eine tragende Rolle. Im Unterschied hierzu ist das Flusssystem mit nur einer Zellart deutlich einfacher aufgebaut. Die empirische Übertragung auf dieses System zeigt deshalb durchaus Ungenauigkeiten,

welche an den nicht idealen Bestimmtheitsmaßen der Geraden in den Diagrammen zur Auswertung zu erkennen ist.

Die Viabilitätsprüfung ergab, dass die Zellen auf die nanoskaligen Arzneistoffträger empfindlicher als auf die Mikrokristalle reagierten. Das reine Coumarin 6 zeigte sich nicht zytotoxisch für die Dauer der Versuche, was wiederum seine Eignung als Modellarzneistoff für mittelgradig hydrophobe Wirkstoffe unterstreicht. Die Kombination aus physikalischer Beanspruchung durch Mediumfluss und großer spezifischer Oberfläche von Coumarin 6-beladenen Liposomen und SLN hat den Zellbestand am Ende der Versuche nicht wesentlich verringert, jedoch die Membranintegrität merklich, aber nicht kritisch beeinträchtigt. Die zum Teil zweistelligen Werte für die Standardabweichung sind der geringen Stichproben- und Zellzahl geschuldet. Eine nachträgliche Viabilitätsfärbung im Mikroflussskanal setzte die Zellen erneut Waschschritten und Reagenzien aus, zusätzlich forderten Inkubations- und Bearbeitungszeiten von bis zu 30 Minuten den Zellen ein erweitertes Anpassungsvermögen an wechselnde Umgebungsbedingungen ab. Von Vorteil wäre hier der Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher wie Tetramethylrhodamin (TMRE) die Integrität von Mitochondrien oder, wie im Falle von Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol (DiBAC₄(3)) die Integrität des Zellmembranpotentials in Echtzeit über Änderungen der Fluoreszenzintensität während eines laufenden Versuchs anzeigen können (Foster et al. 2006; Lin et al. 2008).

4.11 Live Cell Imaging unter Flussbedingungen bei gleichzeitiger und alternierender Umspülung von HCE-T Zellen mit Coumarin 6 und Rhodamin B

Viele Arzneistoffe zur Anwendung am Auge liegen als Kombinationspräparate vor, um den Applikationsaufwand für den Patienten zu minimieren. Als Beispiel hierfür seien Augentropfen mit dem Antibiotikum Gentamicin und dem Glucocorticoid Dexamethason genannt, die bei bakteriell bedingter Entzündung des vorderen Augenabschnittes Verwendung finden. Im Folgenden sollte die gemeinsame bzw. alternierende Applikation der Modellarzneistoffe Coumarin 6 und Rhodamin B im Mikroflussskanal untersucht werden, die beide von HCE-T Zellen aufgenommen werden können. Zunächst sollte die Aufnahme des hydrophileren Rhodamin B unter Flussbedingungen mit einem anschließenden Auswaschschritt charakterisiert werden. Abb. 4-34 zeigt die intra- und extrazelluläre

Fluoreszenzintensität bei Umströmung der Zellen mit einer 0,03 mM Rhodamin B Lösung in KRB im Mikroflussskanal. Mit Einsetzen der Umströmung mit Rhodamin B Lösung nach 2 Minuten stieg die extrazelluläre Fluoreszenz langsam auf weniger als 50 a.u. an, was auf die Verwendung eines 60fach Ölimmersionsobjektives rückführbar ist, welches einen schmalen Fokusbereich aufweist als ein 20fach Objektiv ohne Ölimmersion. Dies führte zu einer relativ geringen Fluoreszenzintensität, weil einerseits die Fluoreszenz von weniger Molekülen erfasst wurde und andererseits weniger Streulicht aus Bereichen außerhalb des Fokusbereiches erfasst wurde. Das Rhodamin B akkumulierte binnen 5 Minuten Kontaktzeit (Abb. 4-34, grau schraffierter Bereich) in den Zellen, was an einem Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz auf bis zu 400 a.u. erkennbar war. Nach dem Wechsel auf die Umspülung mit KRB nach 7,5 Minuten sank die extrazelluläre Fluoreszenz ebenfalls langsam auf den Ausgangswert zurück, weil die molekulardispers verteilten Farbstoffmoleküle zu einer vergleichsweise schnellen Rückdiffusion in das KRB Medium neigten. Die intrazelluläre Fluoreszenzintensität sank bis auf einen Wert von 50 a.u. nach 15 Minuten. Die Auswertung der Kinetik nach dem Abschälverfahren ergab eine Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von ca. $0,33 \text{ min}^{-1}$, woraus eine Eliminationshalbwertszeit des Rhodamin B von ca. 2 Minuten resultierte. Die mittels Extrapolation gewonnene Absorptionsgeschwindigkeitskonstante fiel mit ca. $0,68 \text{ min}^{-1}$ mehr als doppelt so hoch wie die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante aus Abb. 4-35. Die im Vergleich zum Coumarin 6 deutlich geringere Halbwertszeit des Rhodamin B erklärt sich mit dessen größerer Hydrophilie. Sie bedingt dass der Farbstoff schneller aus dem Mikroflusssystem ausgeschwemmt werden kann und von den Zellen in stärkerem Ausmaß freigegeben wird als das lipophilere Coumarin 6. In einem weiteren Experiment wurden HCE-T Zellen alternierend mit Coumarin 6-beladenen SLN und der 0,03 M Rhodamin B Lösung in KRB für jeweils 5 Minuten umspült.

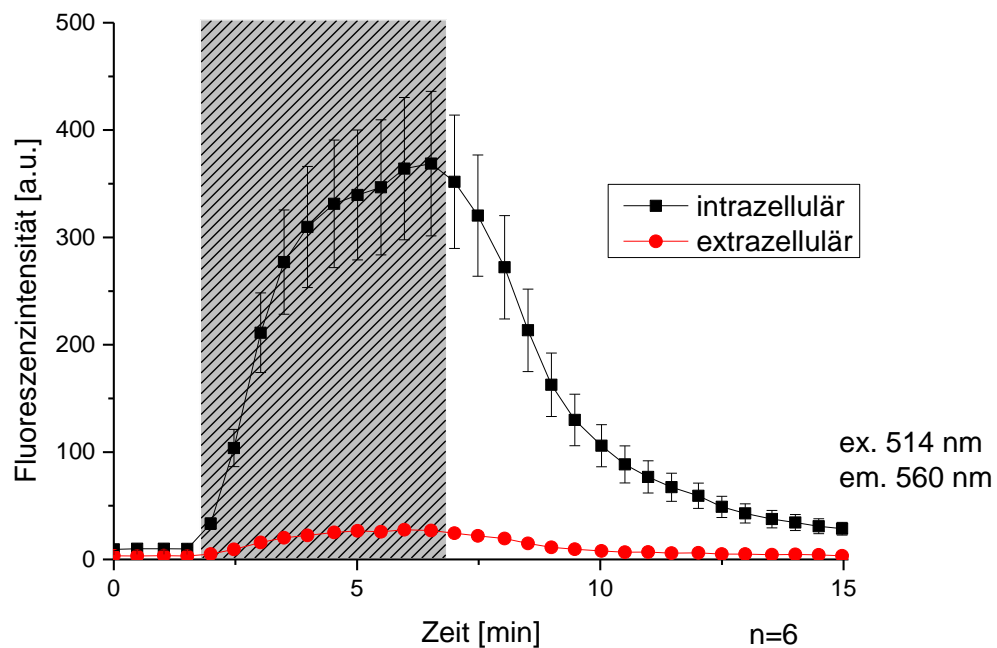


Abb. 4-34: Aufnahme von Rhodamin B aus einer 0,03 mM Lösung in KRB durch HCE-T Zellen unter Flussbedingungen. Der Scherstress betrug 0,1 Pa.

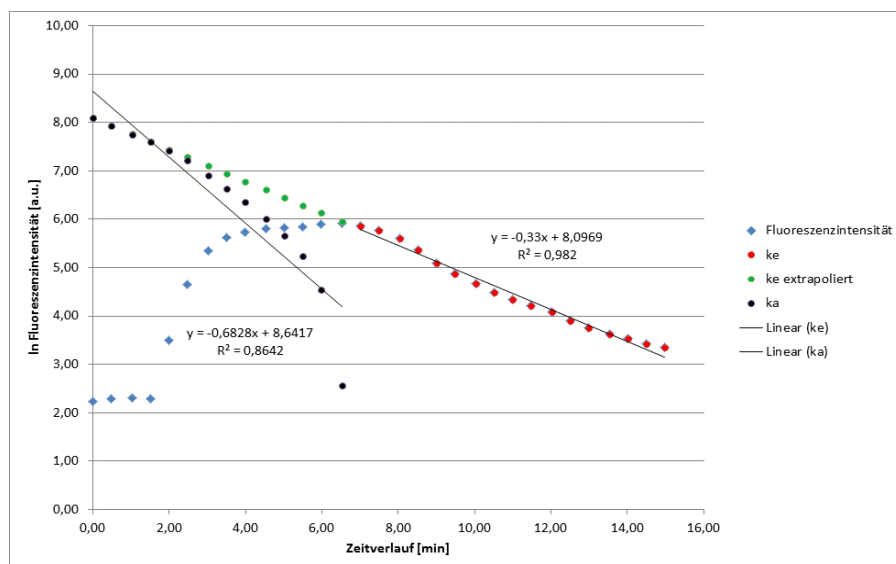


Abb. 4-35: Aus Abb. 4-34 nach dem Abschälverfahren hergeleitete Aufnahme- und Eliminationskinetiken für in KRB gelöstes Rhodamin B (s. Abb. 4-32 erster grauer Balken von links). Die hierüber bestimmte Eliminationsgeschwindigkeitskonstante betrug ca. $0,33 \text{ min}^{-1}$, die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante $0,68 \text{ min}^{-1}$. Die aus ke berechnete Eliminationshalbwertszeit betrug ungefähr 2 Minuten.

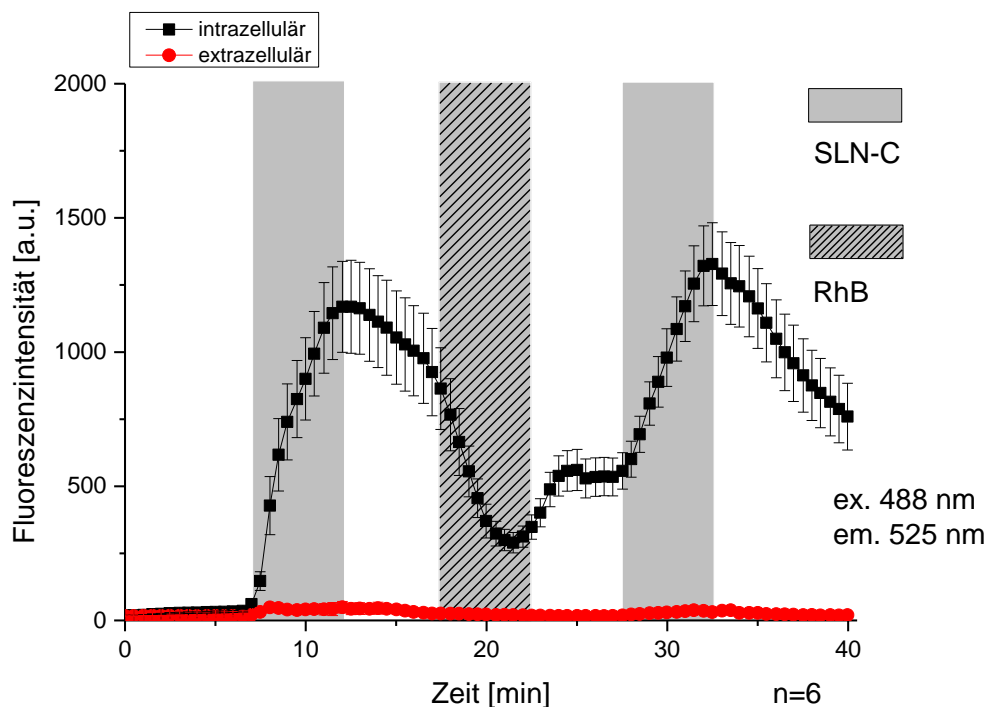


Abb. 4-36: Intensität der Coumarin 6 Fluoreszenz in HCE-T Zellen unter Umspülung mit Coumarin 6-beladenen SLN und einer Rhodamin B Lösung

Abb. 4-36 zeigt den Verlauf von intra- und extrazellulärer Fluoreszenzintensität bei Anregung der Coumarin 6 Fluoreszenz, wobei bei einer der wechselnden Umspülungen eine 0,03 mM Rhodamin B Lösung in KRB verwendet wurde. Wegen der Verwendung eines 60fach Ölimmersionsobjektives waren hierbei die Anstiege der extrazellulären Fluoreszenz bei Beginn der Umspülung der HCE-T Zellen mit Coumarin 6-beladenen SLN kaum erkennbar (Abb. 4-36, grauer Bereich 7,5-12,5 min). Die intrazelluläre Fluoreszenz stieg im gleichen Zeitraum auf 1250 a.u., um dann im folgenden Spülschritt mit KRB auf 900 a.u. abzunehmen. Unter der folgenden Umspülung mit Rhodamin B Lösung (Abb. 4-36, grau schraffierter Bereich, 17,5-22,5 min) sank die intrazelluläre Fluoreszenzintensität deutlich stärker bis auf einen Tiefstwert von 200 a.u. ab. Rhodamin B Moleküle, die in die Zellen diffundiert sind, verursachen offensichtlich ein Quenching der Coumarin 6 Fluoreszenz. Schon vor Beginn der Umspülung mit KRB stieg die Fluoreszenzintensität leicht und stabilisierte sich während der Umspülung mit KRB auf einem Niveau von 600 a.u. Der zeitlich verzögerte Intensitätsanstieg erklärt sich durch die Rückdiffusion von Rhodamin B Molekülen in Bereiche mit reinem KRB, was die örtliche Rhodamin B Konzentration in direkter Zellnähe absinken ließ und somit den beobachteten Quenching-Effekt abschwächte. Bei erneuter Umspülung mit Coumarin 6-beladenen SLN stieg die Fluoreszenzintensität auf einen Maximalwert von

1500 a.u. Die abschließende Umspülung mit KRB ließ sie annähernd linear auf bis zu 750 a.u. fallen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass Rhodamin B einerseits einen Störfaktor bei der Untersuchung der Coumarin 6 Übertragung darstellt. Andererseits ist das Quenching eine notwendige Bedingung für den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Dabei könnte die Lichtemission des Coumarin 6 zur Anregung des Rhodamin B genutzt werden, wenn beide Moleküle nahe genug beieinander lokalisiert sind (Seth et al. 2005).

Die Anwendung des Abschälverfahrens auf die in Abb. 4-36 dargestellten Ergebnisse zeigt für die Umspülung mit SLN-C Werte, welche mit den in Abschnitt 4.9.3 hierfür ermittelten Werten von k_a und k_e in Einklang stehen (Abb. 4-37 und Abb. 4-38). Die Verwendung eines größeren Objektivs scheint demnach keinen Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse zu haben, was der Robustheit der verwendeten Methode zugute kommt.

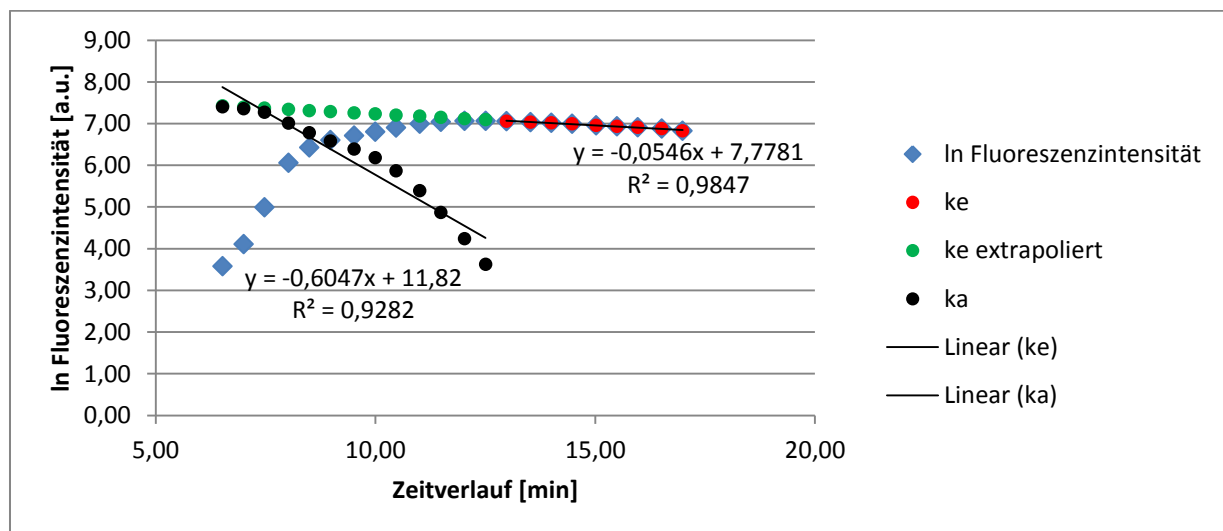


Abb. 4-37: Aus Abb. 4-36 nach dem Abschälverfahren hergeleitete Absorptions- und Eliminationskinetiken für nanopartikuläres Coumarin 6 aus der 1. Anflutung (s. Abb. 4-36 erster grauer Balken von links). Die hierüber bestimmte Eliminationsgeschwindigkeitskonstante betrug $0,0546 \text{ min}^{-1}$, die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante $0,6047 \text{ min}^{-1}$.

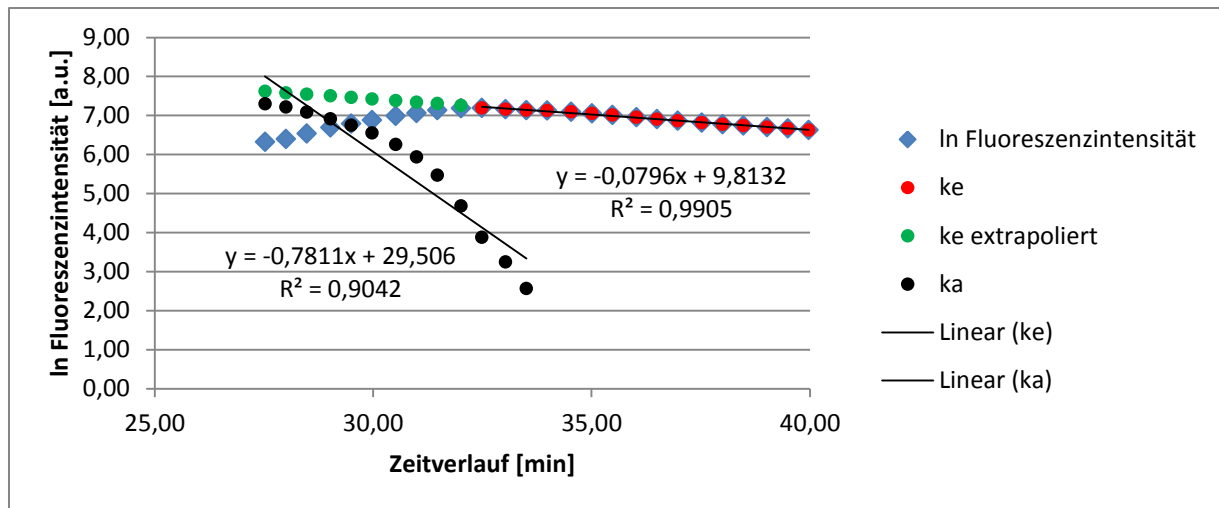


Abb. 4-38: Aus Abb. 4-36 nach dem Abschälverfahren hergeleitete Aufnahme- und Eliminationskinetiken für nanopartikuläres Coumarin 6 aus der 2. Anflutung (s. Abb. 4-36 erster grauer Balken von rechts). Die hierüber bestimmte Eliminationsgeschwindigkeitskonstante betrug $0,0796 \text{ min}^{-1}$, die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante $0,7811 \text{ min}^{-1}$.

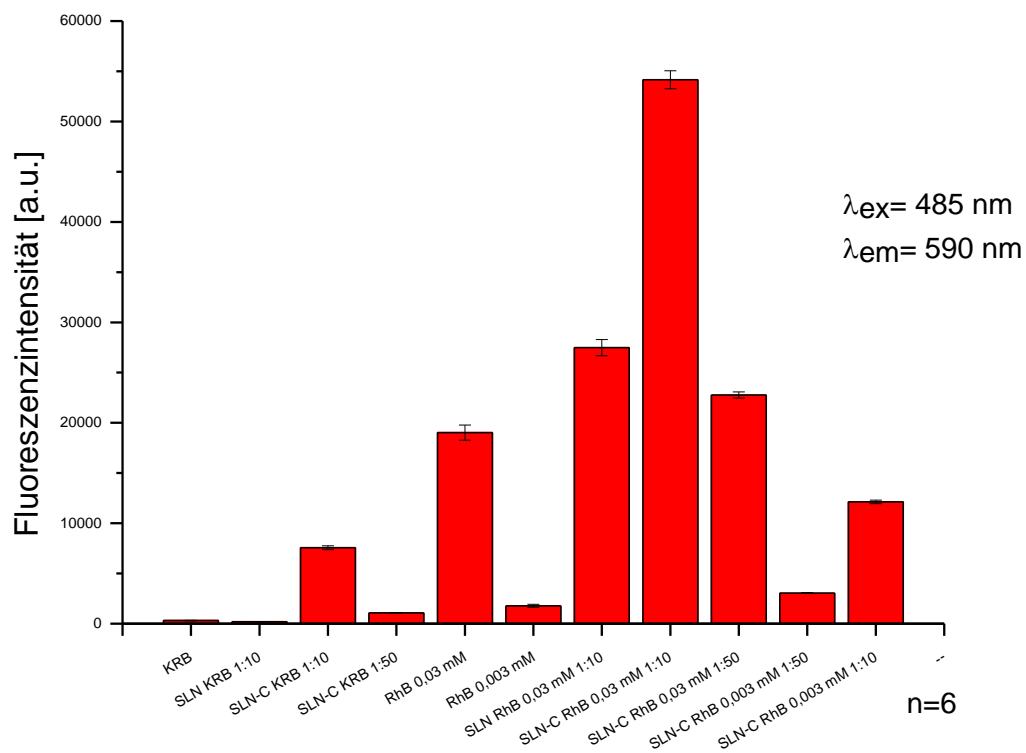


Abb. 4-39: Fluoreszenzintensitäten der Lichtemission von Rhodamin B bei 590 nm nach fluorimetrischer Anregung der Coumarin 6 Fluoreszenz bei 485 nm für verschiedene Formulierungen mit Coumarin 6 oder Rhodamin B und für deren Mischungen.

Dass die Anregung von Rhodamin B mittels Coumarin 6 praktisch möglich ist, zeigt Abb. 4-39. Dargestellt sind verschiedene Formulierungen, die entweder Coumarin 6 oder Rhodamin B enthalten und einzeln oder als Gemische mit Licht der Wellenlänge 485 nm, der Anregungswellenlänge des Coumarin 6, zur Fluoreszenz angeregt wurden. Die Lichtemission wurde hingegen bei einer Wellenlänge von 590 nm vermessen, was der Emissionswellenlänge des Rhodamin B entspricht. Die niedrigste Fluoreszenzintensität erzeugten die Kontrolllösungen von KRB und die 1:10-Verdünnung von SLN in KRB. Die Fluoreszenzintensität der 1:10 Verdünnung von SLN-C mit KRB erscheint fünfmal höher als die der 1:50-Verdünnung von SLN-C mit KRB. Eine Lichtemission von Coumarin 6 ist somit auch noch bei 590 nm messbar und proportional zur Partikelkonzentration. Dies zeigt auch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 0,03 M und 0,003 M Rhodamin B Lösungen zueinander, welches wie das der Konzentrationen 1 zu 10 beträgt. Unter der Zugabe von Lipidnanopartikeln ändert sich das Emissionsverhalten der 0,03 M Rhodamin B Lösung grundlegend. Während SLN in einer 1:10 Verdünnung mit 0,03 M Rhodamin B Lösung die Fluoreszenzintensität nur in geringem Maße steigern, ruft die Zugabe der gleichen Menge SLN-C annähernd eine Verdreifachung der Fluoreszenzintensität hervor. Dass für diesen Effekt eine kritische Partikelkonzentration erforderlich ist, wird deutlich, wenn die Menge an SLN-C auf ein Fünftel reduziert wird. Die Fluoreszenzintensität einer 1:50 Verdünnung von SLN-C mit 0,03 M Rhodamin B Lösung ist nicht wesentlich höher als die der 0,03 M Rhodamin B Lösung ohne Partikel. Bei Verwendung einer 0,003 M Rhodamin B Lösung verstärkt die Zugabe von SLN-C in Form einer 1:10 Verdünnung mit der Lösung die Fluoreszenzintensität sogar um mehr als das Sechsfache (s. Abb. 4-39, Säule 6 von links und Säule 1 von rechts), während die Verminderung der Partikelmenge auf ein Fünftel kaum eine Steigerung hervorruft (s. Abb. 4-39 Säule 2 von rechts). Somit konnte die Anregung von Rhodamin B zur Fluoreszenz durch die Lichtemission von Coumarin 6 gezeigt werden. Dies setzt voraus, dass Rhodamin B und Coumarin 6 Moleküle nah beieinander liegen, entweder in Lösung mit ausreichender Konzentration oder innerhalb von HCE-T Zellen (Gust et al. 2014). Zudem muss das vom angeregten Coumarin 6 emittierte Licht vom Rhodamin B absorbiert werden können, damit dieses zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Somit ist Quenching ebenfalls eine Vorbedingung für FRET, es wird allerdings nicht registriert, da in diesem Fall nicht das von Coumarin 6, sondern das von Rhodamin B emittierte Fluoreszenzlicht detektiert wird. Im Falle einer Umströmung von Zellen mit Coumarin 6-beladenen SLN wäre eine zelluläre Rhodamin B Fluoreszenz ein Signal für in der Nähe der äußeren Zellmembran befindliche SLN.

Rhodamin B flutet intrazellulär vergleichbar schnell wie Coumarin 6 an, jedoch verlässt es die Zellen bei Umspülung mit KRB auch wieder rasch ohne ein Depot zu bilden. Als hydrophiler Modellarzneistoff ist es somit empfindlicher für das Auswaschen durch Körperflüssigkeiten. Die Aufnahme des Coumarin 6 in die Zellen hindert es jedoch nicht.

5 Zusammenfassung

Die Interaktion Coumarin 6-beladener SLN (SLN-C) mit Epithel- und Endothelzellen in einem Mikrokanalsystem unter Ruhe- und unter Flussbedingungen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Toxizität der reproduzierbar mit einer im Rahmen des MikroPART-Projektes entwickelten Mikrokanalanlage hergestellten SLN entsprach in den wesentlichen Punkten den in Vorgängerarbeiten gewonnenen Ergebnissen. Im Rahmen der konfokalmikroskopischen Untersuchung der Coumarin 6 Aufnahme durch Epithel- und Endothelzellen humanen bzw. murinen Ursprungs wurde bereits innerhalb 15-minütiger Inkubation sowohl unter Ruhe- als auch unter Flussbedingungen eine deutliche grüne Coumarin 6 Fluoreszenz beobachtet. Mittels Markierung der SLN mit dem stark lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI und dem fluoreszenzmarkierten Phospholipid NBD- Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamin (NBD-DHPE) erfolgte die Abgrenzung zwischen Farbstoff- und Partikelaufnahme. Die anschließende Untersuchung mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskop (CLSM) ergab keinen Hinweis auf eine partikuläre Aufnahme der SLN durch die untersuchten Zelllinien. Eine Modifizierung der Partikeloberfläche mit positiv geladenen Polyelektrolyten, die zu einer Positivierung des Zetapotentials führte, änderte den Befund nicht. Da sich nicht alle fluoreszenzmarkierten Phospholipide für die Homogenisation im Mikrokanal eignen, konnte durch Einarbeitung von DHPE gezeigt werden, dass eine nachträgliche kovalente Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes DyLight 488[®] an die SLN möglich ist.

Die schnelle Übertragung des lipophilen Modellarzneistoffes Coumarin 6 auf Humane Cornea Epithelzellen (HCE-T) ermöglichte den Einsatz eines aus Mikrobioreaktoren weiterentwickelten Mikrokanalsystems zur *in vitro* Darstellung der Applikation eines lipophilen Arzneistoffes am Auge sowie dessen Auswaschen durch Lidschlag und Tränenfluss. Als Träger für Coumarin 6 dienten SLN, Liposomen und der Farbstoff selbst in Form von Mikrokristallen. Unabhängig davon, ob sich das Trägermedium in Ruhe befand oder die Zellen umströmte, erfolgte die Coumarin 6 Übertragung auf HCE-T Zellen in steigendem Ausmaß in der Reihenfolge Mikrokristalle < SLN < Liposomen. Die unter Flussbedingungen periodisch zwischengeschalteten Waschschriffe zeigten, dass HCE-T Zellen ein Coumarin 6 Depot ausbilden, welches während des Auswaschens nur langsam an Konzentration verarmte. Im Unterschied hierzu erfolgte beim hydrophileren Rhodamin B ein schnelles Auswaschen, welches sich in einer kürzeren Halbwertszeit in der kinetischen

Auswertung mittels Abschälverfahren zeigte. Die parallele Anregung von Coumarin 6 und Rhodamin B mündete im gegenseitigen Quenching der Farbstofffluoreszenzen bzw. dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

6 Conclusion

In this thesis the interaction of Coumarin 6-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-C) with epithelial and endothelial cells of human and murine origin was investigated in a microchannel system under static and under flow conditions. Manufacturing of particles was reproducible by using a micro-manufactured device developed in the context of the MikroPART research project. Particle toxicity was in line with previous publications from our group. Confocal microscopy revealed green fluorescence of Coumarin 6 in epithelial and endothelial cells upon incubation with SLN-C for less than 15 minutes under both static and flow conditions. In order to differentiate between cellular uptake of particles and cellular uptake of the Coumarin 6 molecule itself, particle labeling was done either with DiI as a lipophilic fluorescent dye or with a fluorophore-labeled phospholipid, NBD- dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamine (NBD-DHPE). Subsequent investigations via fluorescence and confocal microscopy (CLSM) revealed no cellular uptake of the particles themselves. Modification of the particle's surface by using positively charged polyelectrolytes leading to a positive zeta potential lead to the same result. Since some fluorophore-labeled phospholipids such as FITC-labeled phospholipids, do not withstand the homogenization procedure during particle manufacturing, subsequent incubation of DHPE-stabilized SLN with a fluorescent dye is also an option as was successfully demonstrated for covalently coupled DyLight 488®.

Along with an apparently fast uptake of the model drug Coumarin 6 by Human Corneal Epithelial Cells (HCE-T), a microchannel system further developed from microbioreactors was used for studying the ocular *in vitro* uptake of Coumarin 6 as a lipophilic model drug with special focus on its clearance due to blinking and tear flow. Coumarin 6 delivery was done by SLN, liposomes and microcrystals of the dye itself for comparison. The amount of Coumarin 6 delivered to HCE-T cells increased in the order microcrystals < SLN < liposomes both under static and under flow conditions. Periodically driven washing steps during flow conditions demonstrated Coumarin 6 incorporation into HCE-T cells. This resulted in an enrichment of Coumarin 6 within the cells which were cleared slowly when being flushed with buffer. In contrast, the more hydrophilic dye Rhodamine B was cleared faster which was in line with a decreased half-life compared to Coumarin 6. Simultaneous fluorescence excitation of both Coumarin 6 and Rhodamine B lead to quenching effects and Förster-Resonance-Energy-Transfer (FRET), respectively.

7 Literaturverzeichnis

Ackermann, G. (2014): Antibiotika und Antimykotika. Substanzen-Krankheitsbilder-Erregerspezifische Therapie. S. 20-23 Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, ISBN: 978-3-8047-2940-7

Alcon Pharma GmbH, Fachinformation Vexol 1 % Augentropfen

National Human Genome Research Institute (2014): An Overview of the Human Genome Project. Bethesda, National Human Genome Research Institute 04.04.2014 [Zugriff am 14.07.2015] Online verfügbar unter <http://www.genome.gov/12011238>

Apple, F. S.; Christenson, R. H.; Valdes Jr., R.; Andriak, A. J.; Berg, A.; Duh, S. H. et al. (1999): Simultaneous Rapid Measurement of Whole Blood Myoglobin, Creatine Kinase MB, and Cardiac Troponin I by the Triage Cardiac Panel for Detection of Myocardial Infarction. In: *Clinical Chemistry*, 45 (2) S. 199–205

Araci, I. E.; Quake, S. R. (2012): Microfluidic very large scale integration (mVLSI) with integrated micromechanical valves. In: *Lab on a chip* 12 (16), S. 2803–2806

Ataç, B.; Wagner, I.; Horland, R.; Lauster, R.; Marx, U.; Tonevitsky, A. G. et al. (2013): Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. In: *Lab on a chip* 13 (18), S. 3555–3561

Attama, A. A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2009): Sustained Release and Permeation of Timolol from Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles through Bioengineered Human Cornea. In: *Curr Eye Res* 34 (8), S. 698–705

Au, A. K.; Lai, H.; Utela, B. R.; Folch, A. (2011a): Microvalves and Micropumps for BioMEMS. In: *Micromachines* 2 (4), S. 179–220

Au, S. H.; Shih, S. C. C.; Wheeler, A. R. (2011b): Integrated microbioreactor for culture and analysis of bacteria, algae and yeast. In: *Biomedical Microdevices* 13 (1), S. 41–50

Autebert, J.; Coudert, B.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. (2012): Microfluidic: an innovative tool for efficient cell sorting. In: *Methods* 57 (3), S. 297–307

Aylward, G. H.; Findlay, T. J. V. (1999): Datensammlung Chemie in SI-Einheiten. 4. Aufl.: Weinheim Wiley VCH, ISBN: 3-527-29468-6

- Banerjee, R.; Mondal, S.; Purkayastha, P. (2016): Revival, enhancement and tuning of fluorescence from Coumarin 6: combination of host–guest chemistry, viscosity and collisional quenching. In: *RSC Adv* 6 (107), S. 105347–105349
- Bastiat, G.; Pritz, C. O.; Roider, C.; Fouchet, F.; Lignières, E.; Jesacher, A. et al. (2013): A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging. In: *Journal of Controlled Release* 170 (3), S. 334–342
- Batist, G.; Ramakrishnan, G.; Rao, C. S.; Chandrasekharan, A.; Gutheil, J.; Guthrie, T. et al. (2001): Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 19 (5), S. 1444–1454
- Baudoin, R.; Griscom, L.; Monge, M.; Legallais, C.; Leclerc, E. (2007): Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models. In: *Biotechnology progress* 23 (5), S. 1245–1253
- Beebe, D. J.; Mensing, G. A.; Walker, G. M. (2002): Physics and Applications of Microfluidics in Biology. In: *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 (1), S. 261–286
- Bejugam, N. K.; Sou, M.; Uddin, A. N.; Gayakwad, S. G.; D'Souza, M. J. (2008): Effect of Chitosans and Other Excipients on the Permeation of Ketotifen, FITC-Dextran, and Rhodamine 123 through Caco-2 Cells. In: *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 23 (2), S. 187–202
- Berger, N.; Sachse, A.; Bender, J.; Schubert, R.; Brandl, M. (2001): Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. In: *International Journal of Pharmaceutics* 223 (1-2), S. 55–68
- Berthier, E.; Young, E. W. K.; Beebe, D. (2012): Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. In: *Lab on a chip* 12 (7), S. 1224–1237
- Bhise, N. S.; Ribas, J.; Manoharan, V.; Zhang, Y. S.; Polini, A.; Massa, S. et al. (2014): Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. In: *Journal of controlled release* 190, S. 82–93
- Blackwell, J. E.; Dagia, N. M.; Dickerson, J. B.; Berg, E. L.; Goetz, D. G. (2001): Ligand Coated Nanosphere Adhesion to E- and P-Selectin under Static and Flow Conditions. In: *Ann Biomed Eng* 29, S. 523–533

- Bocca, C.; Caputo, O.; Cavalli, R.; Gabriel, L.; Miglietta, A.; Gasco, M. R. (1998): Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 175, S. 185–193
- Bother, H.; Waaler, T.; Wik, O. (1990): Rheological Characterization of Tear Substitutes. In: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 16 (5), S. 755–768
- Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *The Journal of Cell Biology* 106 (3), S. 761–771
- Braun, R. J.; King-Smith, P. E.; Begley, C. G.; Li, Longfei; Gewecke, N. R. (2015): Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 45, S. 132–164
- Bunjes, H. (2010): Lipidsysteme zur parenteralen Anwendung - Nanoemulsionen und Lipidnanopartikel; In: Mäder, K; Weidenauer, U. (2010): Innovative Arzneiformen. Ein Lehrbuch für Studium und Praxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, S. 187-207, ISBN: 978-3-8047-2455-6
- Byun, C. K.; Abi-Samra, K.; Cho, Y.-K.; Takayama, S. (2014): Pumps for microfluidic cell culture. In: *ELECTROPHORESIS* 35 (2-3), S. 245–257
- Cate, D. M.; Adkins, J. A.; Mettakoonpitak, J.; Henry, C. S. (2015): Recent developments in paper-based microfluidic devices. In: *Analytical Chemistry* 87 (1), S. 19–41
- Cha, K. H.; Qin, Y.; Meyerhoff, M. E. (2015): Origin of Low Detection Limit and High Selectivity of Roche Accu-Chek Test Strips that Enables Measurement of Tear Glucose Levels. In: *Electroanalysis* 27 (3), S. 670–676
- Cheung, S. Y.; Hanke, T.; Schubert-Zsilavecz, M.; Riemann, E. M. (2015): Arzneistoffe zur Anwendung am Auge - Ein Überblick. In: *Pharmakon* 3 (5), S. 338–347.
- Corporation, Promega: CellTiter-Blue Cell Viability Assay Technical Bulletin, TB317
- Dausend, J.; Musyanovych, A.; Dass, M.; Walther, P.; Schrezenmeier, H.; Landfester, K.; Mailänder, V. (2008): Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. In: *Macromolecular bioscience* 8 (12), S. 1135–1143
- Demming, S.; Sommer, B.; Llobera, A.; Rasch, D.; Krull, R.; Büttgenbach, S. (2011): Disposable parallel poly(dimethylsiloxane) microbioreactor with integrated readout grid for germination screening of *Aspergillus ochraceus*. In: *Biomicrofluidics* 5 (1), S. 14104

- Demming, S. (2011): Disposable Lab-on-Chip systems for biotechnological screening [Dissertation], TU Braunschweig, S. 17-24; Aachen: Shaker-Verlag, ISBN: 978-3-8322-9941-5
- Demming, S.; Peterat, G.; Llobera, A.; Schmolke, H. ; Bruns, A.; Kohlstedt, M. et al. (2012): Vertical microbubble column-A photonic lab-on-chip for cultivation and online analysis of yeast cell cultures. In: *Biomicrofluidics* 6 (3), S. 34106
- Dimmeler, S.; Assmus, B.; Hermann, C.; Haendeler, J.; Zeiher, A. M. (1998): Fluid Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Akt in Human Endothelial Cells. Involvement in Suppression of Apoptosis. In: *Circulation Research* 83 (3), S. 334–341
- Dittrich, P. S.; Manz, A. (2006): Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. In: *Nat Rev Drug Discov* 5 (3), S. 210–218
- Doktorovova, S.; Souto, E. B.; Silva, A. M. (2014): Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 87 (1), S. 1–18
- dos Santos, T.; Varela, J.; Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. (2011): Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. In: *Small* 7 (23), S. 3341–3349
- Douville, N. J.; Tung, Y.-C.; Li, R.; Wang, J. D.; El-Sayed, M. E. H.; Takayama, S. (2010): Fabrication of two-layered channel system with embedded electrodes to measure resistance across epithelial and endothelial barriers. In: *Analytical Chemistry* 82 (6), S. 2505–2511
- Ebrahim, S.; Peyman, G. A.; Lee, P. J. (2005): Applications of Liposomes in Ophthalmology. In: *Survey of Ophthalmology* 50 (2), S. 167–182
- Ebrahimkhani, M. R.; Neiman, Shepard, J. A.; Raredon, M. S. B.; Hughes, D. J.; Griffith, L. G. (2014): Bioreactor technologies to support liver function in vitro. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70, S. 132–157
- Eley, J. G.; Pujari, V. D.; McLane, J. (2004): Poly (Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles Containing Coumarin-6 for Suppository Delivery: In Vitro Release Profile and In Vivo Tissue Distribution. In: *Drug Delivery* 11 (4), S. 255–261
- Esch, M. B.; King, T. L.; Shuler, M. L. (2011): The Role of Body-on-a-Chip Devices in Drug and Toxicity Studies. In: *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13 (1), S. 55–72

- Esch, M. B.; Mahler, G. J.; Stokol, T.; Shuler, M. L. (2014): Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury. In: *Lab on a chip* 14 (16), S. 3081–3092
- Fadda, P.; Monduzzi, M.; Caboi, F.; Piras, S.; Lazzari, P. (2013): Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. In: *International Journal of Pharmaceutics* 446 (1-2), S. 166–175
- Fangueiro, J. F.; Andreani, T.; Egea, M. A.; Garcia, M. L.; Souto, S. B.; Silva, A. M.; Souto, E. B. (2014): Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. In: *International Journal of Pharmaceutics* 461 (1-2), S. 64–73
- Ferrell, N.; Desai, R. R.; Fleischman, A. J.; Roy, S.; Humes, H. D.; Fissell, W. H. (2010): A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* 107 (4), S. 707–716
- Fery-Forgues, S.; El-Ayoubi, R.; Lamère, J.-F. (2008): Fluorescent Microcrystals Obtained from Coumarin 6 Using the Reprecipitation Method. In: *J Fluoresc* 18 (3-4), S. 619–624
- Fillafer, C.; Ratzinger, G.; Neumann, J.; Guttenberg, Z.; Dissauer, S.; Lichtscheidl, I. K. et al. (2009): An acoustically-driven biochip – impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers. In: *Lab Chip* 9 (19), S. 2782–2788
- Finke, J. H.; Schur, J.; Richter, C.; Gothsch, T.; Kwade, A.; Büttgenbach, S.; Müller-Goymann, C. C. (2012a): The influence of customized geometries and process parameters on nanoemulsion and solid lipid nanoparticle production in microsystems. In: *Chemical Engineering Journal* 209, S. 126–137
- Finke, J. H.; Richter, C.; Gothsch, T.; Kwade, A.; Büttgenbach, S.; Müller-Goymann, C. C. (2014): Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy? In: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (9), S. 1234–1246
- Finke, J. H.; Schmolke, H.; Klages, C.-P.; Müller-Goymann, C. C. (2013): Controlling solid lipid nanoparticle adhesion by polyelectrolyte multilayer surface modifications. In: *International Journal of Pharmaceutics* 449 (1-2), S. 59–71

- Firdessa, R.; Oelschlaeger, T. A.; Moll, H. (2014): Identification of multiple cellular uptake pathways of polystyrene nanoparticles and factors affecting the uptake: relevance for drug delivery systems. In: *European journal of cell biology* 93 (8-9), S. 323–337
- Flach, A. J. (2008): The importance of eyelid closure and naolacrima occlusion following the ocular instillation of topical glaucoma medications and the need for the universal inclusion of one of these techniques in all patient treatments and clinical studies. In: *Trans Am Ophthalmol Soc*, 106, S. 138–148
- Fleiszig, S. M. J.; Arora, S. K.; Van, R.; Ramphal, R. (2001): FlhA, a Component of the Flagellum Assembly Apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a Role in Internalization by Corneal Epithelial Cells. In: *Infection and Immunity* 69 (8), S. 4931–4937
- Florea, B. I.; Cassara, M. L.; Junginger, H. E.; Borchard, G. (2003): Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. In: *Journal of Controlled Release* 87 (1-3), S. 131–138
- Floyd, A. G. (1999): Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. In: *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2 (4), S. 134–143
- Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. In: *J Natl Cancer Inst* 59, S. 221–225
- Foster, K. A.; Galeffi, F.; Gerich, F. J.; Turner, D. A.; Müller, M. (2006): Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. In: *Progress in Neurobiology* 79 (3), S. 136–171
- Freitas, C.; Müller, R. H. (1998): Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN TM) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. In: *J Microencapsulation* 16 (1), S. 59–71
- Friedrich, I.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2005): Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). In: *International Journal of Pharmaceutics* 305 (1-2), S. 167–175
- Gardiner, C.; Longair, I.; Hills, J.; Cohen, H.; Mackie, I. J.; Machin, S. J. (2008): Performance evaluation of a new small-volume coagulation monitor: the SmartCheck INR system. In: *American journal of clinical pathology* 129 (3), S. 500–504
- Gasco, M. R. (1993): Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. US 5.250.236, 05.10.1993

- Gross, A.; Schoendube, J.; Zimmermann, S.; Steeb, M.; Zengerle, R.; Koltay, P. (2015): Technologies for Single-Cell Isolation. In: *International journal of molecular sciences* 16 (8), S. 16897–16919
- Gust, A.; Zander, A.; Gietl, A.; Holzmeister, P.; Schulz, S.; Lalkens, B. et al. (2014): A Starting Point for Fluorescence-Based Single-Molecule Measurements in Biomolecular Research. In: *Molecules* 19 (10), S. 15824–15865
- Hahne, M.; Zorn-Kruppa, M.; Guzman, G.; Brandner, J. M.; Haltner-Ukomado, E.; Wätzig, H.; Reichl, S. (2012): Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 101 (8), S. 2976–2988
- Harink, B.; Le Gac, S.; Truckenmüller, R.; van Blitterswijk, C.; Habibovic, P. (2013): Regeneration-on-a-chip? The perspectives on use of microfluidics in regenerative medicine. In: *Lab on a chip* 13 (18), S. 3512–3528
- Hegab, H. M.; Elmekawy, A.; Stakenborg, T. (2013): Review of microfluidic microbioreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. In: *Biomicrofluidics* 7 (2), S. 21502
- Hemmerich, P. H.; von Mikecz, A. H. (2013): Defining the Subcellular Interface of Nanoparticles by Live-Cell Imaging. In: *PLoS ONE* 8 (4), e62018
- Herd, H.; Daum, N.; Jones, A. T.; Huwer, H.; Ghandehari, H.; Lehr, C.-M. (2013): Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. In: *ACS Nano* 7 (3), S. 1961–1973
- Hippalgaonkar, K.; Majumdar, S.; Kansara, V. (2010): Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. In: *AAPS PharmSciTech* 11 (4), S. 1526–1540
- Hosta-Rigau, L.; Städler, B. (2013): Shear Stress and Its Effect on the Interaction of Myoblast Cells with Nanosized Drug Delivery Vehicles. In: *Mol. Pharmaceutics* 10 (7), S. 2707–2712
- Huang, S.-B.; Wu, M.-H.; Wang, S.-S.; Lee, G.-B.; (2011): Microfluidic cell culture chip with multiplexed medium delivery and efficient cell/scaffold loading mechanisms for high-throughput perfusion 3-dimensional cell culture-based assays. In: *Biomedical Microdevices* 13 (3), S. 415–430

- Hung, L. C.; Basri, M.; Tejo, B. A.; Ismail, R.; Nang, H. L. L.; Hassan, H. A.; May, C. Y. (2011): An improved method for the preparations of nanostructured lipid carriers containing heat-sensitive bioactives. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87 (1), S. 180–186
- Jang, K.-J.; Suh, K.-Y.; (2010): A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. In: *Lab on a chip* 10 (1), S. 36–42
- Joseph, S.; Bunjes, H. (2014): Evaluation of Shirasu Porous Glass (SPG) membrane emulsification for the preparation of colloidal lipid drug carrier dispersions. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (1), S. 178–186
- Jung, W.; Han, J.; Choi, J.-W.; Ahn, C. H. (2015): Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. In: *Microelectronic Engineering* 132, S. 46–57
- Araki-Sasaki, K.; Ohashi, Y.; Sasabe, T.; Hayashi, K.; Watanabe, H.; Tano, Y.; Handa, H. (1995): An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36 (3), S. 614–621
- Karuri, N. W.; Porri, T. J.; Albrecht, R. M.; Murphy, C. J.; Nealey, P. F. (2006): Nano- and Microscale Holes Modulate Cell-Substrate Adhesion, Cytoskeletal Organization, and Integrin Localization in SV40 Human Corneal Epithelial Cells. In: *IEEE Trans.on Nanobioscience* 5 (4), S. 273–280.
- Kim, D.; Lin, Y.-S.; Haynes, C. L. (2011): On-Chip Evaluation of Shear Stress Effect on Cytotoxicity of Mesoporous Silica Nanoparticles. In: *Anal. Chem.* 83 (22), S. 8377–8382
- Kim, H. J.; Huh, D.; Hamilton, G.; Ingber, D. E. (2012): Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. In: *Lab on a chip* 12 (12), S. 2165–2174
- Kim, H. J.; Ingber, D. E. (2013): Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. In: *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 5 (9), S. 1130–1140
- Kircher, W. (2015): Augenarzneimittel korrekt angewandt. In: *Pharmakon* 3 (5), S. 355–361.
- Kona, S.; Dong, J.-F.; Liu, Y.; Tan, J.; Nguyen, K. T. (2012): Biodegradable nanoparticles mimicking platelet binding as a targeted and controlled drug delivery system. In: *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2), S. 516–524

- Kostov, Y.; Harms, P.; Randers-Eichhorn, L.; Rao, G. (2001): Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. In: *Biotechnology and Bioengineering* 72 (3), S. 347–352
- Kristl, J.; Plajnshek, K. T.; Erdani Kreft, M.; Janković, B.; Kocbek, P. (2013): Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their distribution between cells through tunneling nanotubes. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(1), S. 139–148
- Kristoffersen, A. S.; Erga, S. R.; Hamre, B.; Frette, Ø. (2014): Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Rhodamine B, Coumarin 6 and Lucifer Yellow. In: *J Fluoresc* 24 (4), S. 1015–1024
- Küchler, S.; Abdel-Mottaleb, M.; Lamprecht, A.; Radowski, M. R.; Haag, R.; Schäfer-Korting, M. (2009): Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. In: *International Journal of Pharmaceutics* 377 (1-2), S. 169–172
- Kuo, T.-R.; Lee, C.-F.; Lin, S.-J.; Dong, C.-Y.; Chen, C.-C.; Tan, H.-Y.; (2011): Studies of intracorneal distribution and cytotoxicity of quantum dots: risk assessment of eye exposure. In: *Chemical research in toxicology* 24 (2), S. 253–261
- Kusunose, J.; Zhang, H.; Gagnon, M. K. J.; Pan, T.; Simon, S. I.; Ferrara, K. W. (2013): Microfluidic System for Facilitated Quantification of Nanoparticle Accumulation to Cells Under Laminar Flow. In: *Ann Biomed Eng* 41 (1), S. 89–99
- Lee, C.-Y.; Chang, C.-L.; Wang, Y.-N.; Fu, L.-M.; (2011): Microfluidic mixing: a review. In: *International journal of molecular sciences* 12 (5), S. 3263–3287
- Leonardi, A.; Bucolo, C.; Romano, G. L.; Platania, C. B. M.; Drago, F.; Puglisi, G.; Pignatello, R.; (2014): Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 470 (1-2), S. 133–140
- Lieber, M.; Smith, B.; Szaka, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro, G. (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. In: *Int. J. Cancer* 17, S. 62–70
- Lin, W.; Stayton, I.; Huang, Y.-W.; Zhou, X.-D.; Ma, Y. (2008): Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells A549. In: *Toxicological & Env. Chem.* 90 (5), S. 983–996

- Liu, Z.; Zhang, W.; Huang, F.; Feng, H.; Shu, W.; Xu, X.; Chen, Y. (2013): High throughput capture of circulating tumor cells using an integrated microfluidic system. In: *Biosensors & bioelectronics* 47, S. 113–119
- Lombry, C.; Bosquillon, C.; Pr  at, V.; Vanbever, R. (2002): Confocal imaging of rat lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. In: *Journal of Controlled Release* 83 (3), S. 331–341
- Luecha, J.; Hsiao, A.; Brodsky, S.; Liu, G. L.; Kokini, J. L. (2011): Green microfluidic devices made of corn proteins. In: *Lab on a chip* 11 (20), S. 3419–3425
- M  der, K.; Weidenauer, U. (2010): Innovative Arzneiformen. Ein Lehrbuch f  r Studium und Praxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, ISBN: 978-3-8047-2455-6
- Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D. (2002): Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). In: *Chemistry and Physics of Lipids* 116 (1-2), S. 3–18
- Makwana, P. K.; Jethva, P. N.; Roy, I. (2011): Coumarin 6 and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as fluorescent probes to monitor protein aggregation. In: *Analyst* 136 (10), S. 2161–2167
- Mulisch, M.; Welsch, U. (2010): Romeis - Mikroskopische Technik. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, ISBN: 978-3-8274-2254-5
- Martin, I.; Wendt, D.; Heberer, M. (2004): The role of bioreactors in tissue engineering. In: *Trends in biotechnology* 22 (2), S. 80–86
- Maschmeyer, I.; Lorenz, A. K.; Schimek, K.; Hasenberg, T.; Ramme, A. P.; H  bner, J. et al. (2015): A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. In: *Lab on a chip* 15 (12), S. 2688–2699
- McNeil GmbH, Fachinformation Livocab Augentropfen 2016
- Mehnert, W.; M  der, K. (2001): Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2-3), S. 165–196
- Mehnert, W.; M  der, K. (2012): Solid lipid nanoparticles. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, S. 83–101
- Miyabe, K.; Kawaguchi, Y.; Guiochon, G. (2010): Kinetic study on external mass transfer in high performance liquid chromatography system. In: *Journal of chromatography. A* 1217 (18), S. 3053–3062

Müller, R. H.; Lucks, S. (1992): Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosphären (SLN)) - European Patent Office - EP 0605497 B1, 16.09.1992

Müller, R. H.; Mäder, K.; Gohla, S. (2000): Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (1), S. 161–177

Müller, R. H.; Rühl, D.; Runge, S.; Schulze-Forster, K.; Mehnert, W. (1997): Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant. In: *Pharmaceutical Research* 14 (4), S. 458–462

Nassimi, M. (2010): Lipidnanopartikel als Arzneistoffträger für die pulmonale Applikation, TU Braunschweig

Nassimi, M.; Schleh, C.; Lauenstein, H. D.; Hussein, R.; Hoymann, H. G.; Koch, W. et al. (2010a): A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75 (2), S. 107–116

Nge, P. N.; Rogers, C. I.; Woolley, A. T. (2013): Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. In: *Chemical reviews* 113 (4), S. 2550–2583

Nguyen, N.-T. (2004): Mikrofluidik. Entwurf, Herstellung und Charakterisierung; mit 12 Tabellen und 37 Beispielen. 1. Aufl. Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: Teubner, ISBN: 978-3-322-80069-5

Paddock, S. W. (1999): Confocal Laser Scanning Microscopy. In: *BioTechniques* 27 (5), S. 992–1004

Pajk, S. (2014): Synthesis and fluorescence properties of environment-sensitive 7-(diethylamino)coumarin derivatives. In: *Tetrahedron Letters* 55 (44), S. 6044–6047

Paranjpe, M.; Finke, J. H.; Richter, C.; Gothsch, T.; Kwade, A.; Büttgenbach, S.; Müller-Goymann, C. C. (2014): Physicochemical characterization of sildenafil-loaded solid lipid nanoparticle dispersions (SLN) for pulmonary application. In: *International Journal of Pharmaceutics* 476 (1-2), S. 41–49

Paranjpe, M.; Neuhaus, V.; Finke, J. H.; Richter, C.; Gothsch, T.; Kwade, A. et al. (2013): In vitro and ex vivo toxicological testing of sildenafil-loaded solid lipid nanoparticles. In: *Inhalation Toxicology* 25 (9), S. 536–543

- Park, Y.; Huang, R.; Corti, D. S.; Franses, E. I. (2010): Colloidal dispersion stability of unilamellar DPPC vesicles in aqueous electrolyte solutions and comparisons to predictions of the DLVO theory. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 342 (2), S. 300–310
- Pasirayi, G.; Auger, V.; Scott, S. M.; Rahman, P.K.S.M.; Islam, M.; O'Hare, L.; Ali, Z. (2011): Microfluidic Bioreactors for Cell Culturing: A Review. In: *Micro and Nanosystems* 3 (2), S. 137–160
- Peng, C.-C.; Liao, W.-H.; Chen, Y.-H.; Wu, C.-Y.; Tung, Y.-C.; (2013): A microfluidic cell culture array with various oxygen tensions. In: *Lab on a chip* 13 (16), S. 3239–3245
- Peterat, G.; Schmolke, H.; Lorenz, T.; Llobera, A.; Rasch, D.; Al-Halhouli, A. T. et al. (2014): Characterization of oxygen transfer in vertical microbubble columns for aerobic biotechnological processes. In: *Biotechnol. Bioeng.* 111 (9), S. 1809–1819
- Petersen, S.; Steiniger, F.; Fischer, D.; Fahr, A.; Bunjes, H. (2011): The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 79 (1), S. 150–161
- Pietzonka, P. (2002): Transfer of Lipophilic Markers from PLGA and Polystyrene Nanoparticles to Caco-2 Monolayers Mimics Particle Uptake. In: *Pharmaceutical Research* 19, S. 595–601
- Pignatello, R.; Carbone, C.; Puglia, C.; Offerta, A.; Bonina, F. P.; Puglisi, G. (2015): Ophthalmic applications of lipid-based drug nanocarriers: an update of research and patenting activity. In: *Therapeutic delivery* 6 (11), S. 1297–1318
- Pilarek, M.; Neubauer, P.; Marx, U. (2011): Biological cardio-micro-pumps for microbioreactors and analytical micro-systems. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 156 (2), S. 517–526
- Plajnšek, K. T.; Pajk, S.; Govedarica, B.; Pečar, S.; Srčič, S.; Kristl, J. (2011): A novel fluorescent probe for more effective monitoring of nanosized drug delivery systems within the cells. In: *International Journal of Pharmaceutics* 416 (1), S. 384–393
- Plendl, J.; Sinowatz, F.; Auerbach, R. (1995): A transformed murine myocardial vascular endothelial cell clone: characterization of cells in vitro and of tumours derived from the clone in situ. In: *Virchows Arch*, S. 619–628
- Polacheck, W. J.; Li, R.; Uzel, S. G. M.; Kamm, Roger D. (2013): Microfluidic platforms for mechanobiology. In: *Lab on a chip* 13 (12), S. 2252–2267

Pretor, S.; Bartels, J.; Lorenz, T.; Dahl, K.; Finke, J. H.; Peterat, G. et al. (2014): Cellular Uptake of Coumarin-6 under Microfluidic Conditions into HCE-T Cells from Nanoscale Formulations. In: *Molecular pharmaceutics* 12(1), S. 34-45

Prina-Mello, A.; Samuel, J.; O'Dowd, P.; Kashanin D.; Gerard, V.; Gun'ko, Y. K. et al. (2012): Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow. In: *Int J Nanomed*, 2012:7 S. 2943–2956

Ramasamy, T. G.; Haidar, Z. S. (2011): Layer-by-Layer Self-Assembly of Polymeric Multi-Layers on Solid Lipid Nanoparticles: A Comparative Study via Dynamic Light Scattering, Transmission Electron Microscope, Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. In: *J Bionanosci* 5 (2), S. 155–161

Regehr, K. J.; Domenech, M.; Koepsel, J. T.; Carver, K. C.; Ellison-Zelski, S. J.; Murphy, W. L. et al. (2009): Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. In: *Lab Chip* 9 (15), S. 2132–2139

Reneman, R. S.; Hoeks, A. P. G. (2008): Wall shear stress as measured in vivo: consequences for the design of the arterial system. In: *Med Biol Eng Comput* 46 (5), S. 499–507

Rote Liste 2015 Diclo-Vision sine.

Rote Liste 2015 Infectoazid 15 mg/ml.

Rote Liste 2015 Voltaren ophtha.

Schäpper, D.; Alam, M. N. H. Z.; Szita, N.; Eliasson Lantz, A; Gernaey, K. V. (2009): Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. In: *Anal Bioanal Chem* 395 (3), S. 679–695

Schimek, K.; Busek, M.; Brincker, S.; Groth, B.; Hoffmann, S.; Lauster, R. et al. (2013): Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. In: *Lab on a chip* 13 (18), S. 3588–3598

Schubert, M. A.; Müller-Goymann, C.C. (2005): Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61 (1-2), S. 77–86

Schubert, M. A.; Harms, M.; Müller-Goymann, C. C. (2006): Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27 (2-3), S. 226–236

- Schubert, R. (2010): Liposomen; In: Mäder, K.; Weidenauer, U. (2010): Innovative Arzneiformen. Ein Lehrbuch für Studium und Praxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, S. 149-165, ISBN: 978-3-8047-2455-6
- Seetharaman, S.; Barrand, M. A.; Maskell, L.; Scheper, R. J. (1998): Multidrug Resistance-Related Transport Proteins in Isolated Human Brain Microvessels and in Cells Cultured from These Isolates. In: *Journal of Neurochemistry* 70 (3), S. 1151–1159
- Selimović, S.; Dokmeci, M. R.; Khademhosseini, A. (2013): Organs-on-a-chip for drug discovery. In: *Current opinion in pharmacology* 13 (5), S. 829–833
- Seth, D.; Chakrabarty, D.; Chakraborty, A.; Sarkar, N.; (2005): Study of energy transfer from 7-amino coumarin donors to rhodamine 6G acceptor in non-aqueous reverse micelles. In: *Chemical Physics Letters* 401 (4-6), S. 546–552
- Sharma, A.; Tandon, A.; Tovey, J. C. K.; Gupta, R.; Robertson, J. D.; Fortune, J. A. et al. (2011): Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. In: *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 7 (4), S. 505–513
- Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R. R.; Sastry, M. (2005): Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. In: *Langmuir* 21 (23), S. 10644–10654
- Silva, A. C.; González-Mira, E.; García, M. L.; Egea, M. A.; Fonseca, J.; Silva, R. et al. (2011): Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86 (1), S. 158–165
- Sjöström, B.; Bergenståhl, B. (1992): Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. In: *International Journal of Pharmaceutics* 88 (1-3), S. 53–62
- Spillmann, C. M.; Naciri, J.; Algar, W. R.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B. (2014): Multifunctional Liquid Crystal Nanoparticles for Intracellular Fluorescent Imaging and Drug Delivery. In: *ACS Nano* 8 (7), S. 6986–6997
- Steinhaus, B.; Garcia, M. L.; Shen, A. Q.; Angenent, L. T. (2007): A portable anaerobic microbioreactor reveals optimum growth conditions for the methanogen *Methanosaeta concilii*. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (5), S. 1653–1658

- Suh, H.; Jeong, B.; Liu, F.; Kim S. W. (1998): Cellular Uptake Study of Biodegradable Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells. In: *Pharm Res* 15 (9), S. 1495–1498
- Suh, Y. K.; Kang, S. (2010): A Review on Mixing in Microfluidics. In: *Micromachines* 1 (3), S. 82–111
- Sung, J. H.; Kam, C.; Shuler, M. L. (2010): A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. In: *Lab on a chip* 10 (4), S. 446–455
- Sung, J. H.; Shuler, M. L. (2010): In vitro microscale systems for systematic drug toxicity study. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 33 (1), S. 5–19
- Szita, N.; Boccazzi, P.; Zhang, Z.; Boyle, P.; Sinskey, A. J.; Jensen, K. F. (2005): Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing. In: *Lab on a chip* 5 (8), S. 819–826
- Szita, N.; Polizzi, K.; Jaccard, N.; Baganz, F. (2010): Microfluidic approaches for systems and synthetic biology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (4), S. 517–523
- Tanaka, Y.; Sato, K.; Shimizu, T.; Yamato, M.; Okano, T.; Kitamori, T. (2007): A microspherical heart pump powered by cultured cardiomyocytes. In: *Lab on a chip* 7 (2), S. 207–212
- Tiffany, J. M. (1991): The viscosity of human tears. In: *International Ophthalmology* (15), S. 371–376.
- Torchilin, V. P. (2005): Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. In: *Nat Rev Drug Discov* 4 (2), S. 145–160
- Trieu, D.; Waddell, T. K.; McGuigan, A. P. (2014): A microfluidic device to apply shear stresses to polarizing ciliated airway epithelium using air flow. In: *Biomicrofluidics* 8 (6), S. 64104
- Turillazzi, E.; Karch, S. B.; Neri, M.; Pomara, C.; Riezzo, I.; Fineschi, V. (2008): Confocal laser scanning microscopy. Using new technology to answer old questions in forensic investigations. In: *Int J Legal Med* 122 (2), S. 173–177
- Vyawahare, S.; Zhang, Q.; Lau, A.; Austin, R. H. (2014): In vitro microbial culture models and their application in drug development. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70, S. 217–224
- Walker, G. M.; Zeringue, H. C.; Beebe, D. J. (2004): Microenvironment design considerations for cellular scale studies. In: *Lab Chip* 4 (2), S. 91-97

- Wang, W.; Yan, Y.; Li, C. W.; Xia, H. M.; Chao, S. S.; Wang, D. Y.; Wang, Z. P. (2014): Live human nasal epithelial cells (hNECs) on chip for in vitro testing of gaseous formaldehyde toxicity via airway delivery. In: *Lab on a chip* 14 (4), S. 677–680
- Wengst, A.; Reichl, S. (2010): RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 74 (2), S. 290–297
- Wieloch, M.; Hillarp, A.; Strandberg, K.; Nilsson, C.; Svensson, P. J. (2009): Comparison and evaluation of a Point-of-care device (CoaguChek XS) to Owren-type prothrombin time assay for monitoring of oral anticoagulant therapy with warfarin. In: *Thrombosis research* 124 (3), S. 344–348
- Yoon, J.-Y.; Kim, B. (2012): Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety. In: *Sensors* 12 (8), S. 10713–10741
- Young, E. W. K.; Simmons, C. A. (2010): Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. In: *Lab on a chip* 10 (2), S. 143–160
- Yu, Z. T. F.; Aw, Y.; Koh, M.; Fu, J. (2014): Microfluidic blood cell sorting: now and beyond. In: *Small* 10 (9), S. 1687–1703
- Zhang, M.; Li, H.; Ma, H.; Qin, J. (2013): A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model. In: *Wound repair and regeneration* 21 (6), S. 897–903
- Zimmer, A.; Kreuter, J.; Robinson, J. R. (1991): Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues. In: *J Microencapsulation* 8 (4), S. 497–504

8 Anhang Abbildungen

8.1 TEM-Aufnahmen

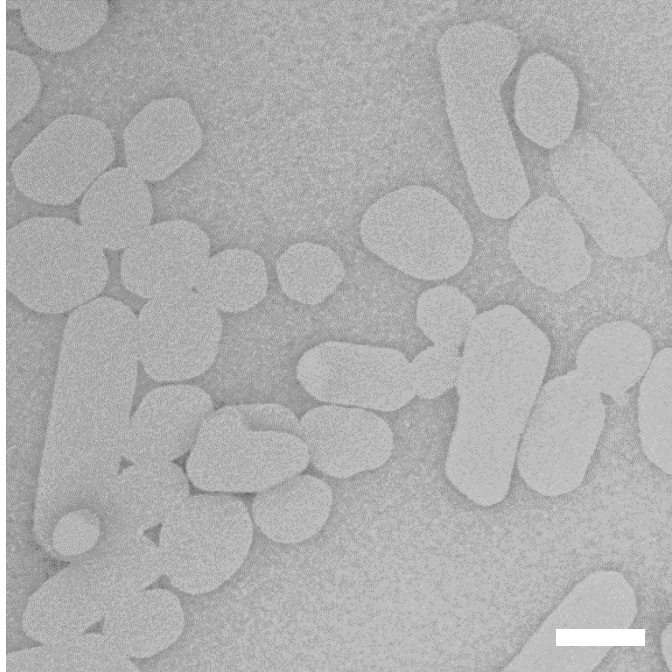


Abb. 8-1: TEM-Aufnahme von SLN NBD unter Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Der Messbalken entspricht 200 nm.

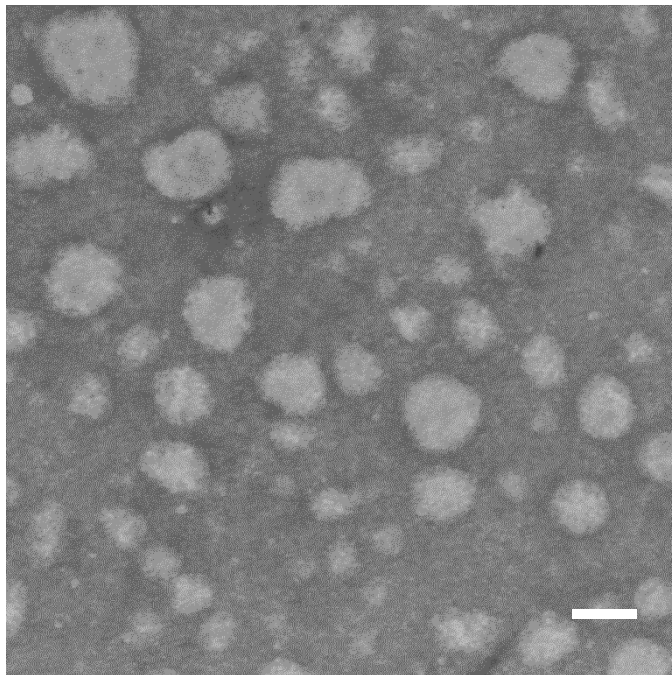


Abb. 8-2: TEM-Aufnahme einer Nanoemulsion aus Mittelkettigen Triglyceriden mit einem Coumarin 6 Anteil von 0,025 % unter Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Der Messbalken entspricht 200 nm.

8.2 SLN-Toxizität auf HCE-T

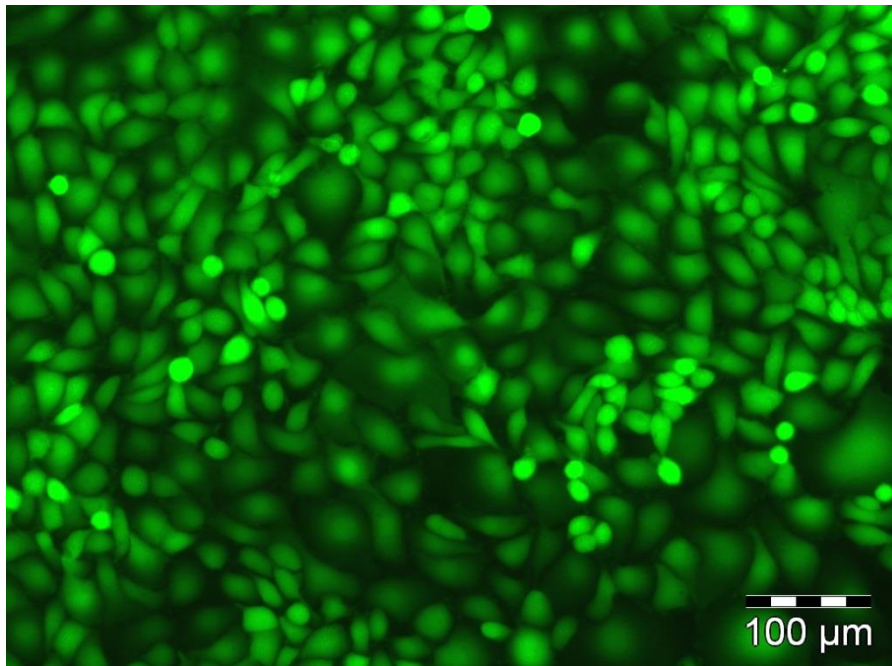


Abb. 8-3: Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung von HCE-T-Zellen nach Inkubation mit Medium

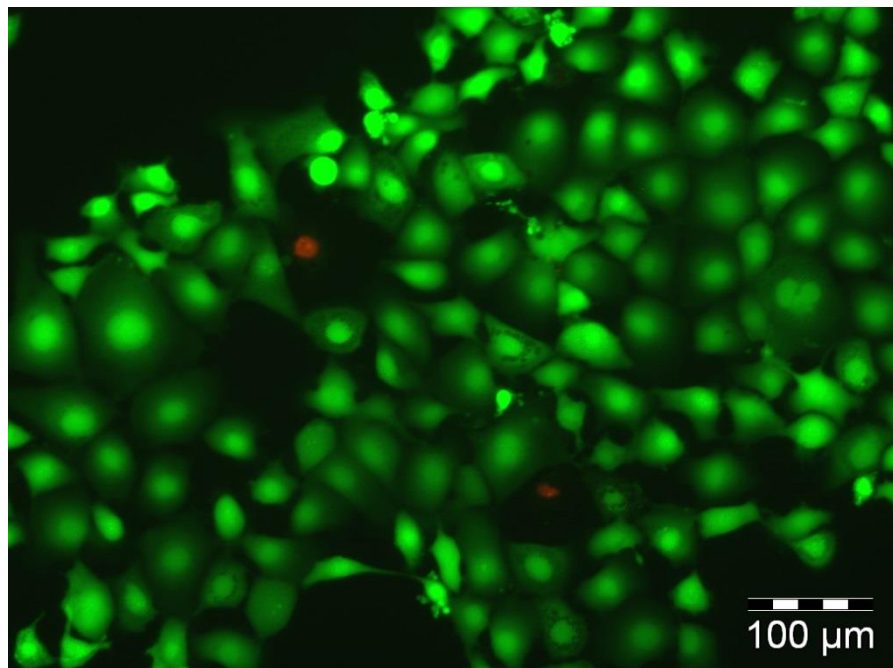


Abb. 8-4: Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung von HCE-T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SLN 500 µg/mL

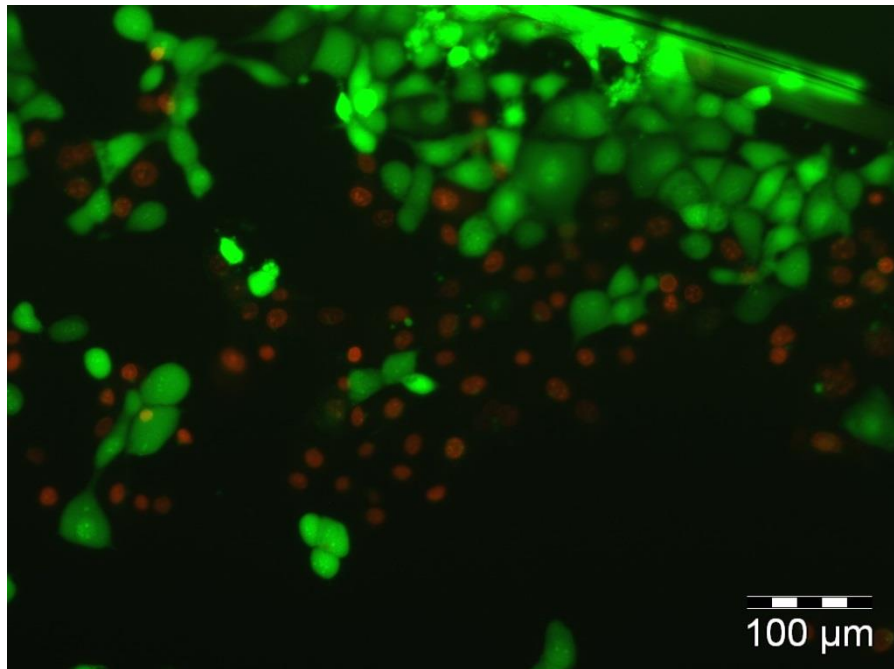


Abb. 8-5: Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung von HCE-T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SLN 750 µg/mL

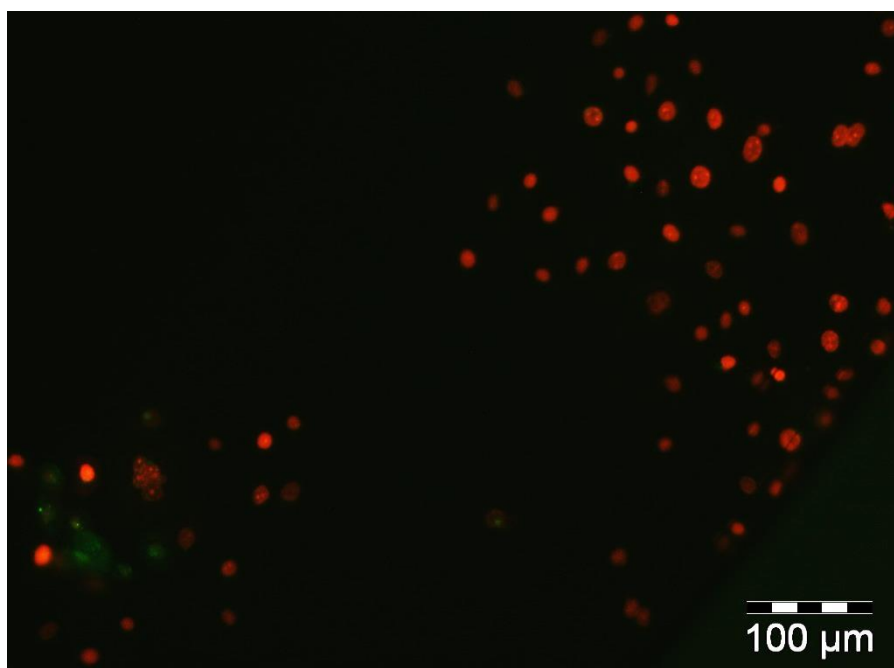


Abb. 8-6: Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung von HCE-T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SLN 1000 µg/mL

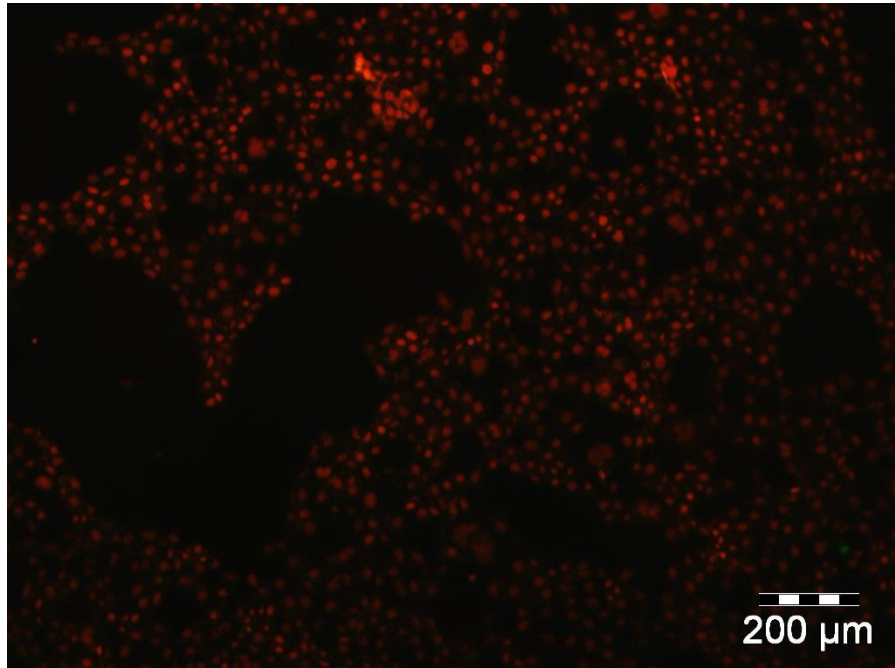


Abb. 8-7: Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung von HCE-T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Staurosporin 0,5 mM

8.3 A549, CaLu-3 und MHEC5-T mit SLN-C und SLN-DHPE

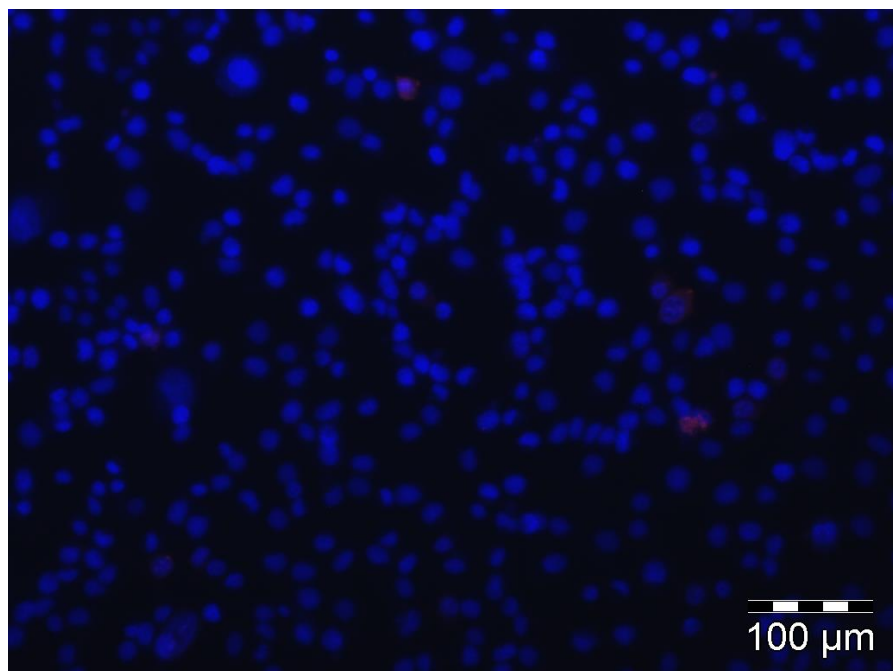


Abb. 8-8: A549 Zellen nach Inkubation mit Kultivierungsmedium für eine Stunde. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit einer Mischung aus Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

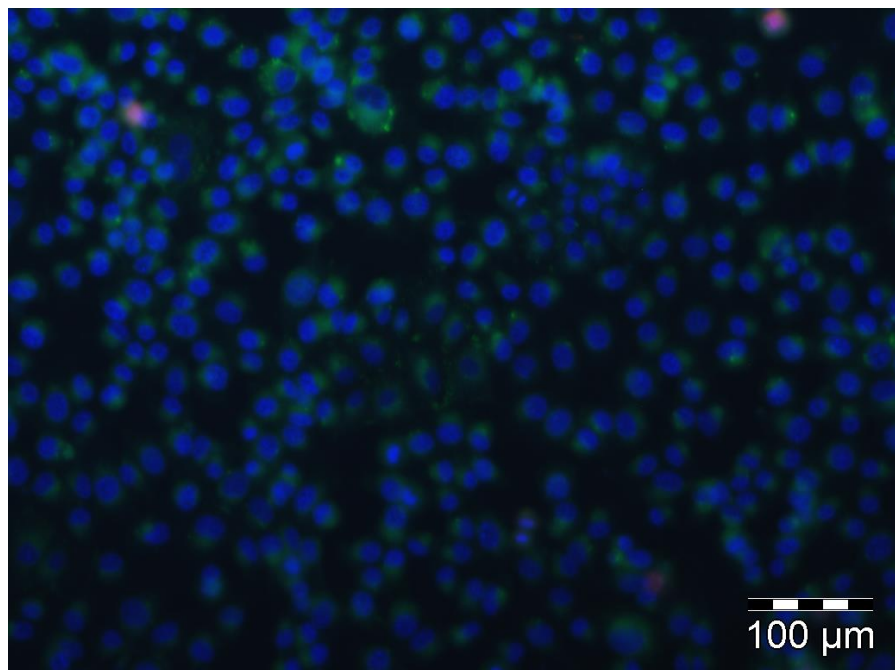


Abb. 8-9: A549 Zellen eine Stunde nach der Inkubation mit Coumarin 6-beladenen SLN und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

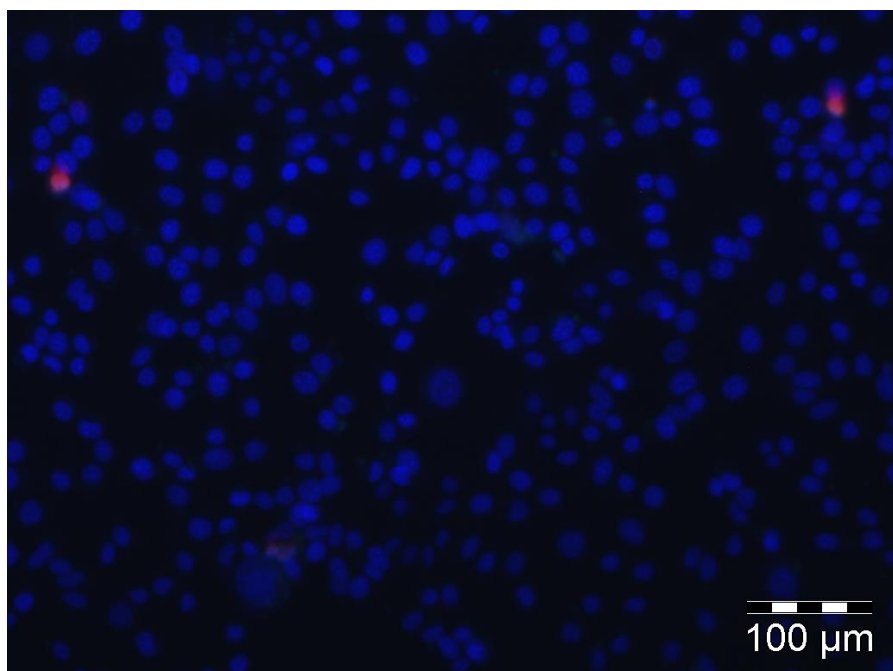


Abb. 8-10: A549 Zellen eine Stunde nach der Inkubation mit SLN-DHPE und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

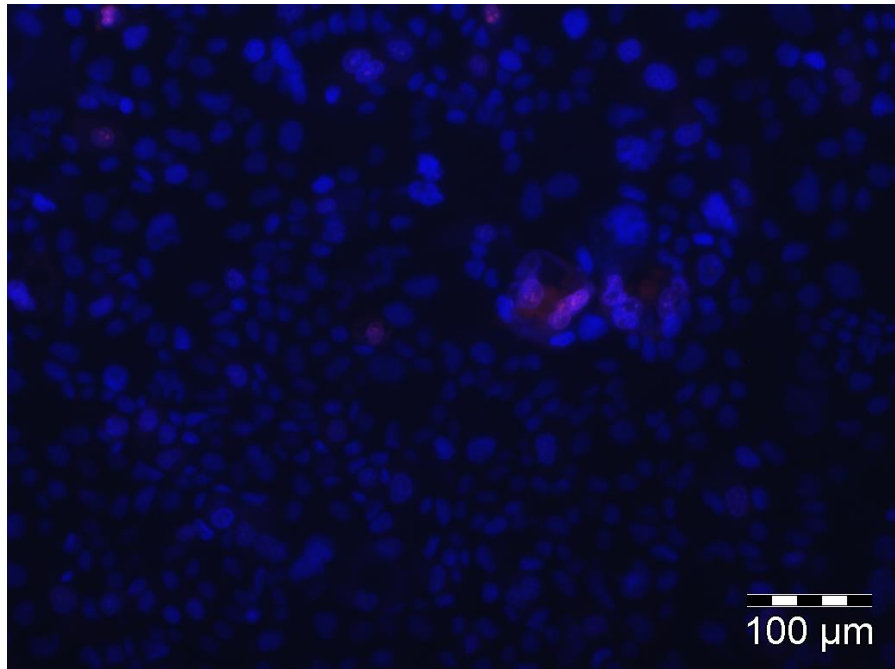


Abb. 8-11: CaLu-3 Zellen nach einstündiger Inkubation mit Kultivierungsmedium und anschließender Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

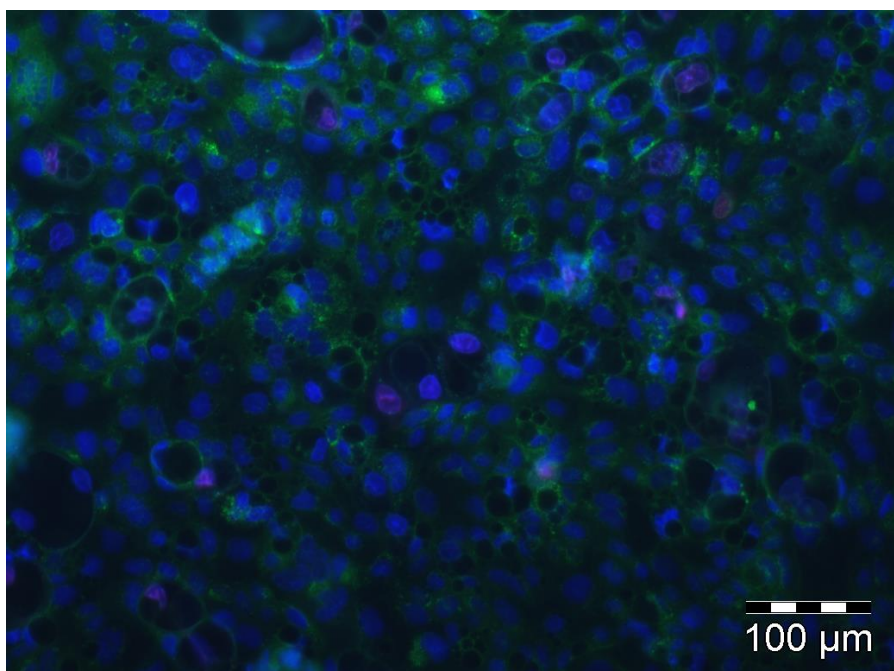


Abb. 8-12: CaLu-3 Zellen eine Stunde nach der Inkubation mit Coumarin 6-beladenen SLN und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

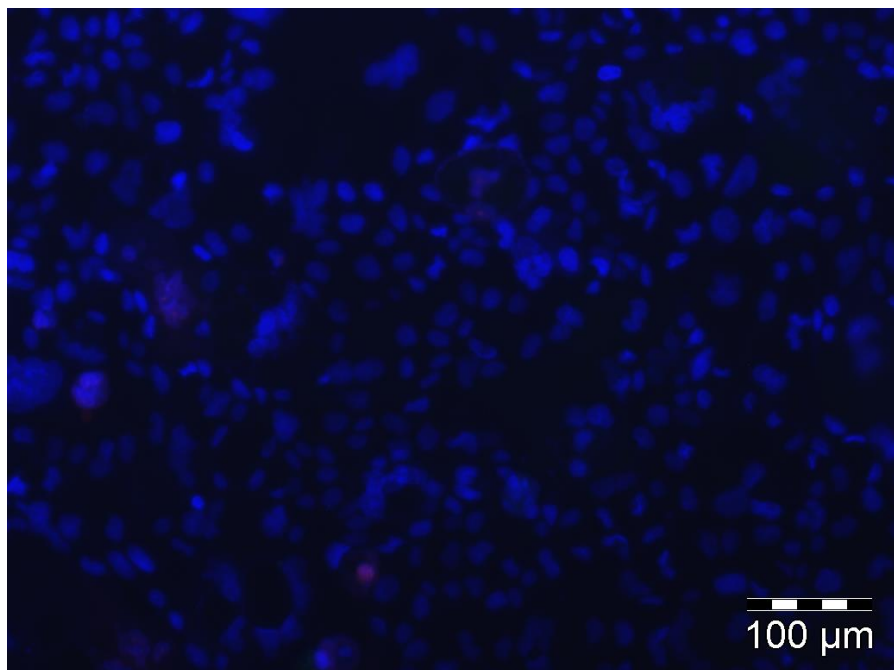


Abb. 8-13: CaLu-3 Zellen eine Stunde nach der Inkubation mit SLN-DHPE und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

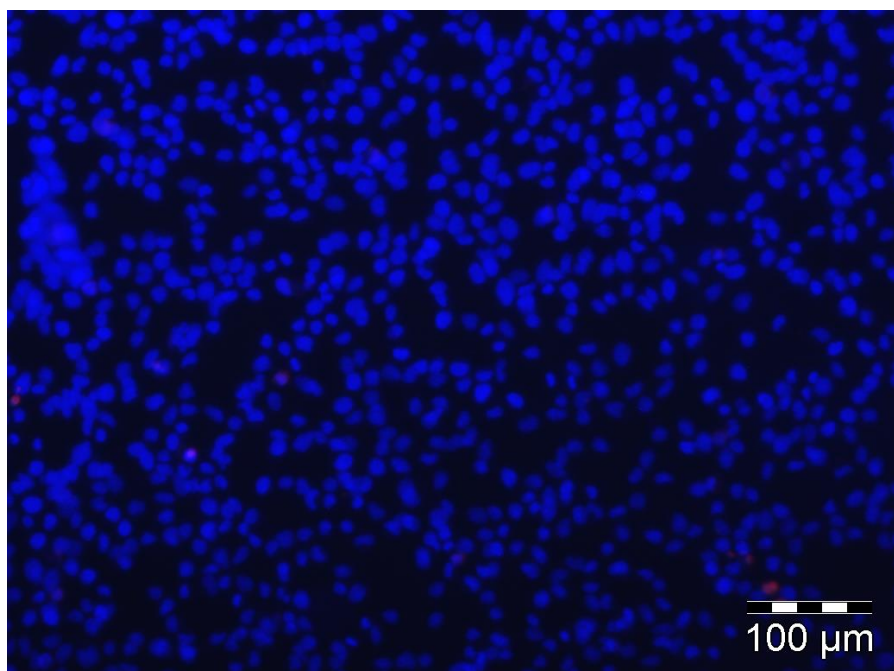


Abb. 8-14: MHEC5-T Zellen nach einstündiger Inkubation mit Kultivierungsmedium und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

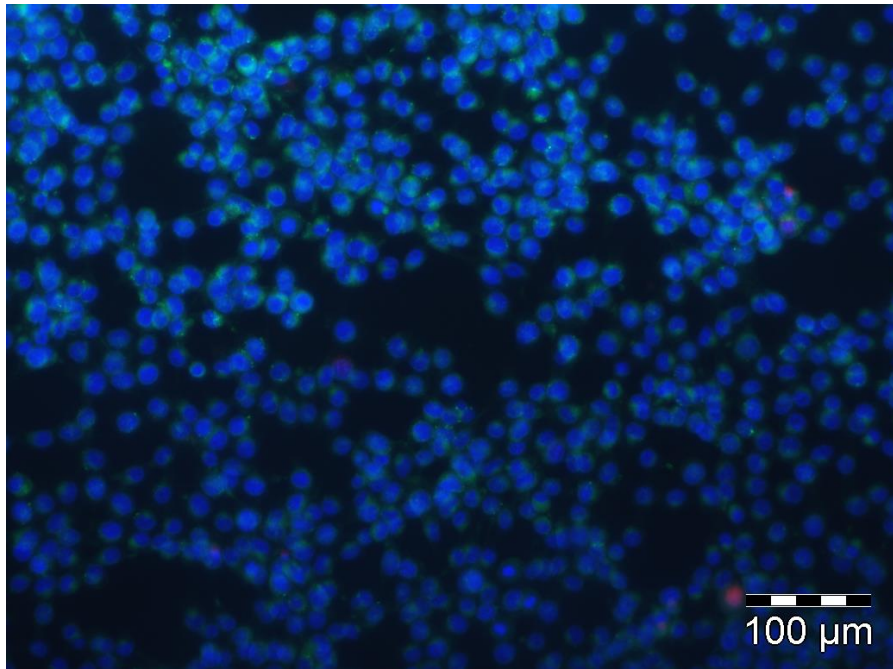


Abb. 8-15: MHEC5-T Zellen nach einstündiger Inkubation mit Coumarin 6-beladenen SLN und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

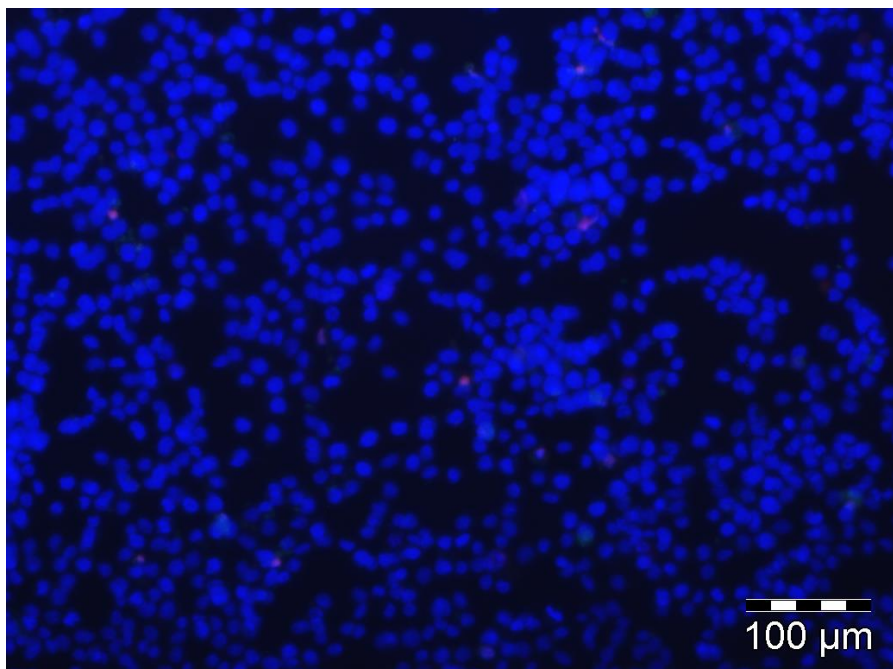


Abb. 8-16: MHEC5-T Zellen nach einstündiger Inkubation mit SLN-DHPE und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.

8.4 A549, CaLu-3 und HCE-T mit SLN DiI, SLN DiI PAH, SLN DiI PDADMAC und SLN DiI Poly-D-Lysin

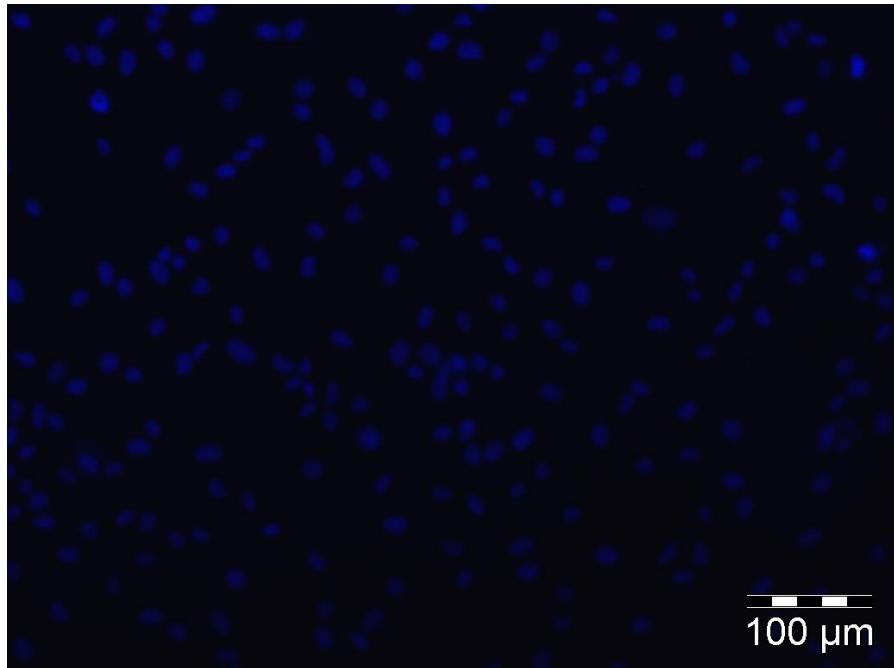


Abb. 8-17: A549 Zellen im Kultivierungsmedium nach Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

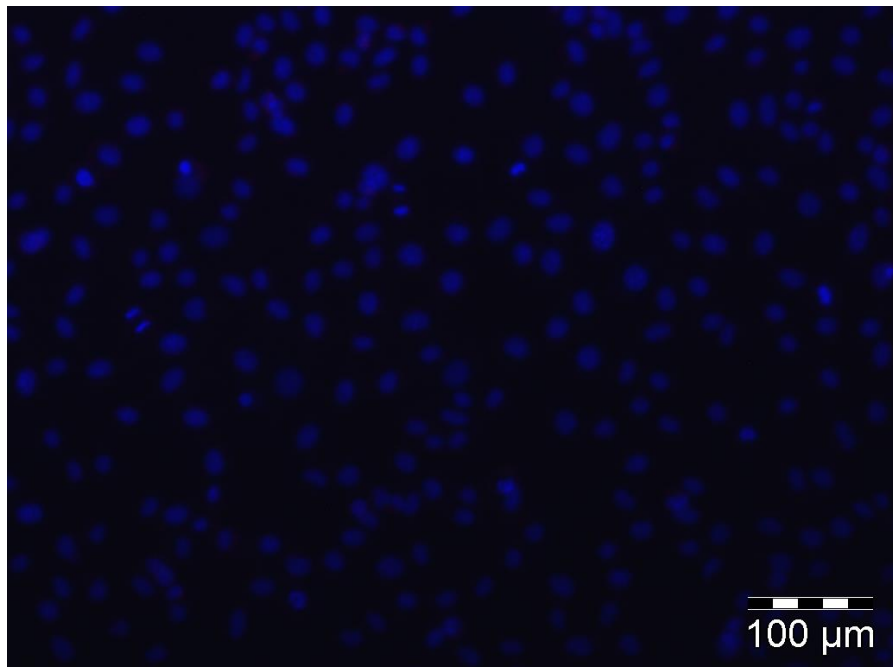


Abb. 8-18: A549 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI PAH und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

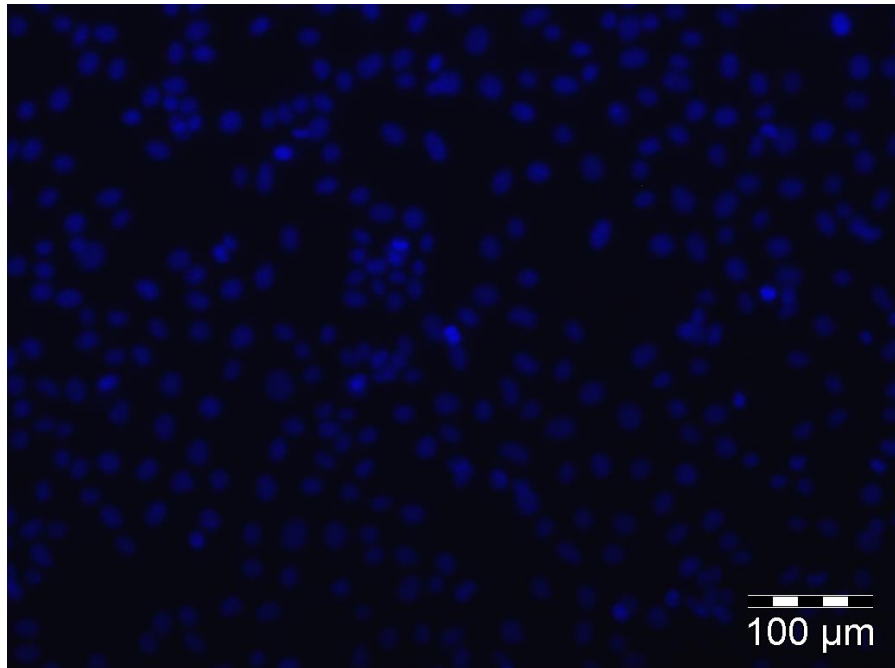


Abb. 8-19: A549 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI PDADMAC und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

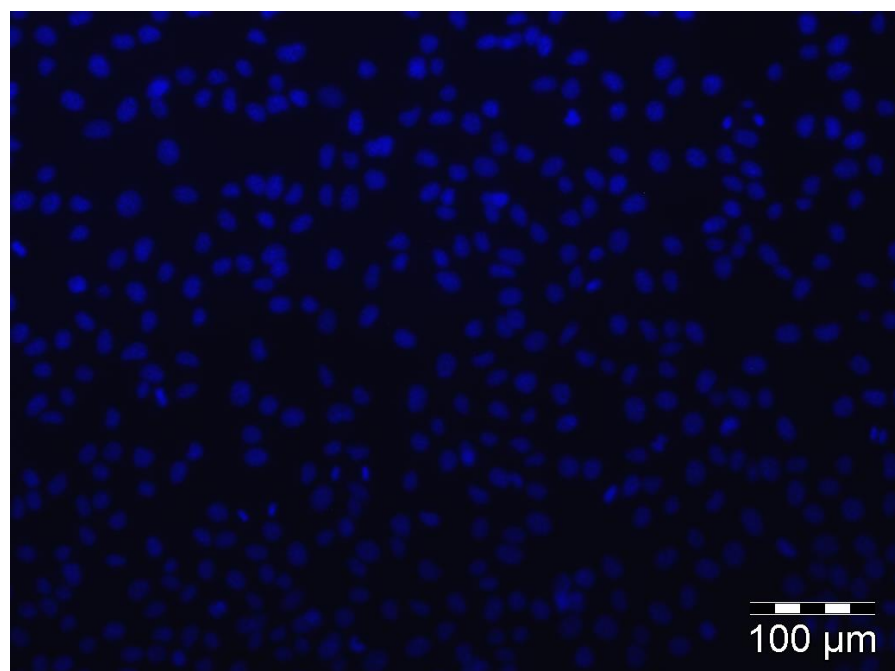


Abb. 8-20: A549 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

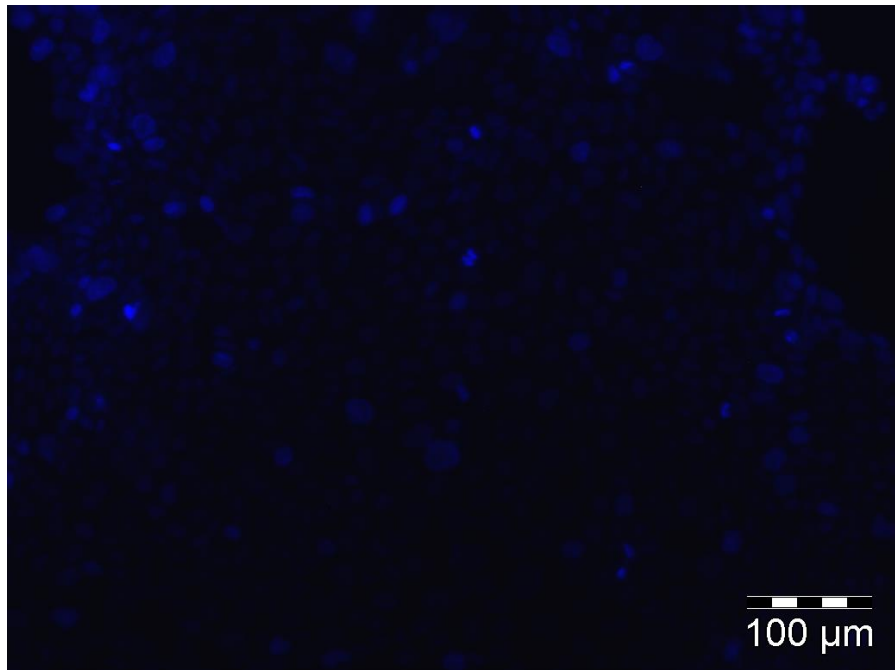


Abb. 8-21: CaLu-3 Zellen in Kultivierungsmedium nach Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

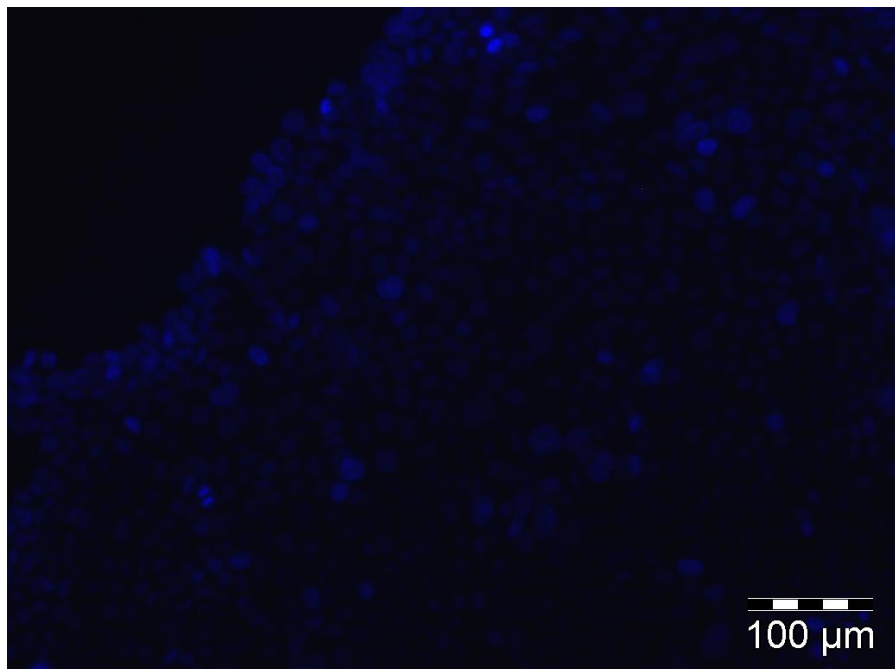


Abb. 8-22: CaLu-3 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI PAH und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

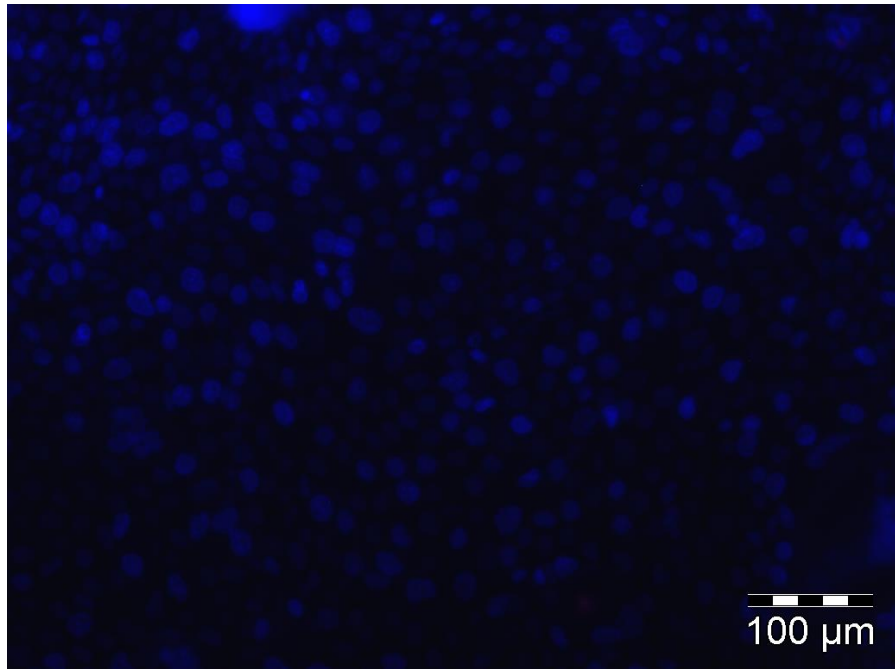


Abb. 8-23: CaLu-3 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI PDADMAC und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

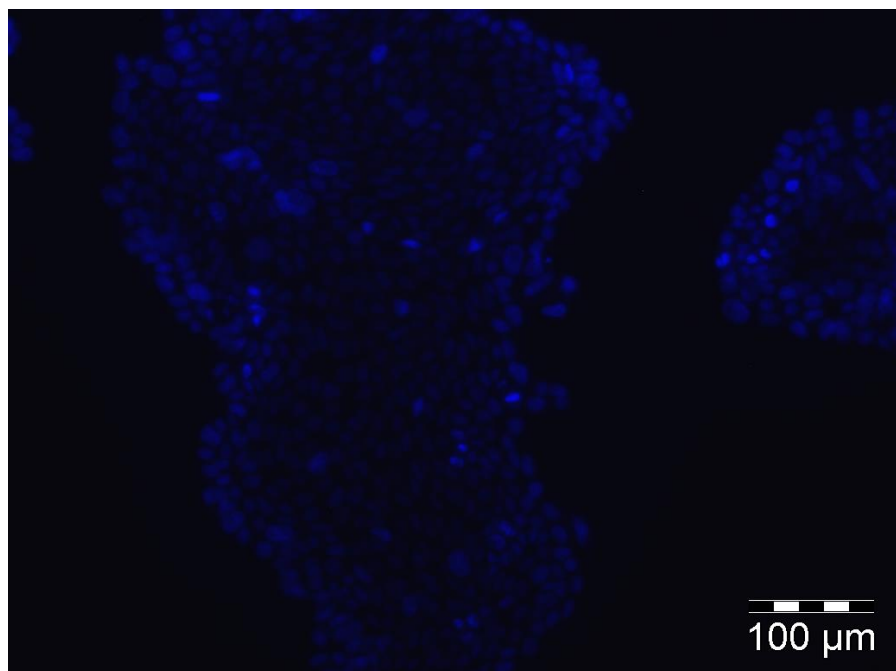


Abb. 8-24: CaLu-3 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit SLN DiI und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

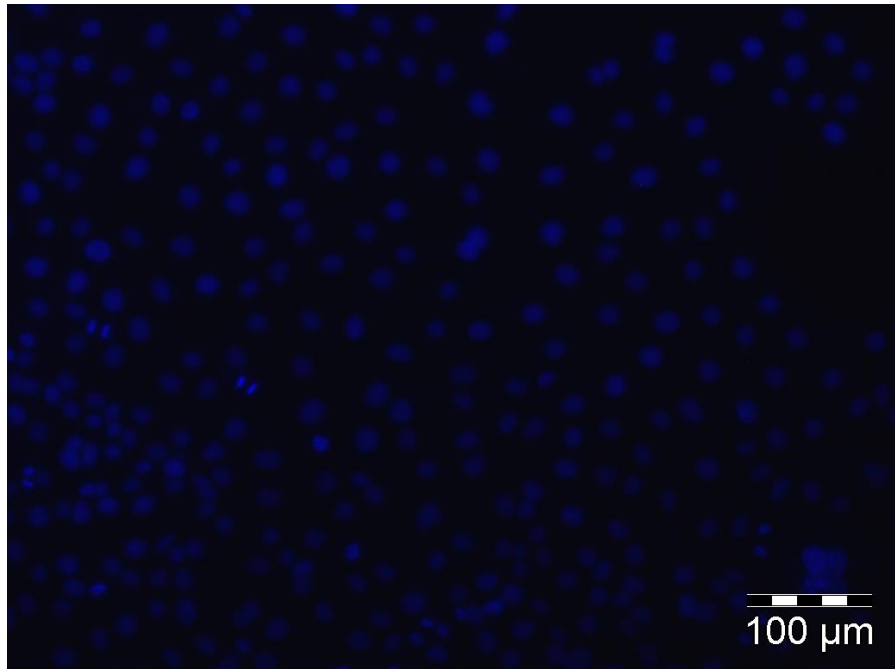


Abb. 8-25: HCE-T Zellen nach Kultivierung im Medium und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

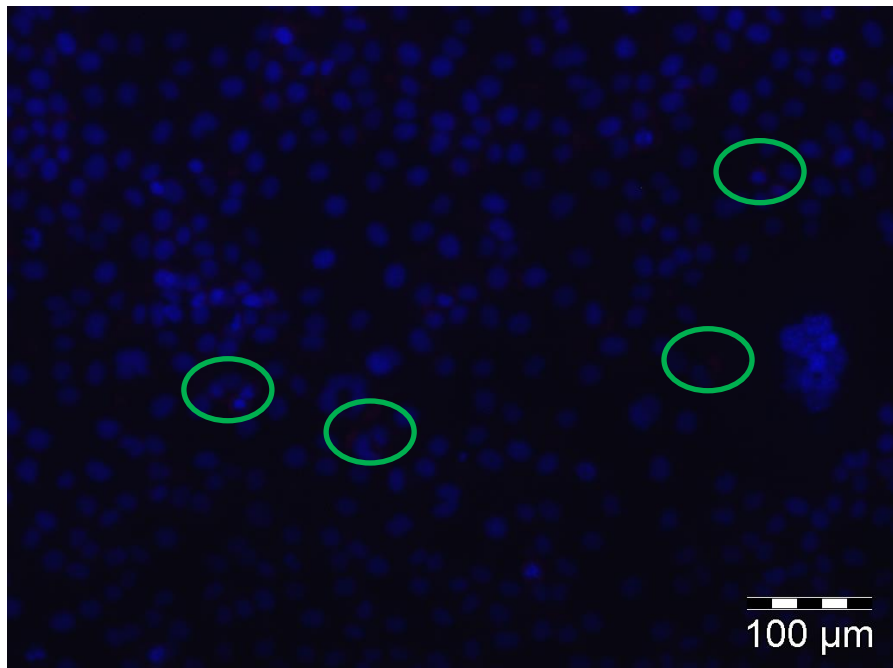


Abb. 8-26: HCE-T Zellen nach zweistündiger Inkubation mit Poly-D-Lysin-modifizierten SLN DiI und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

8.5 Aufnahme von Coumarin 6 und SLN durch HCE-T Zellen unter Ruhebedingungen

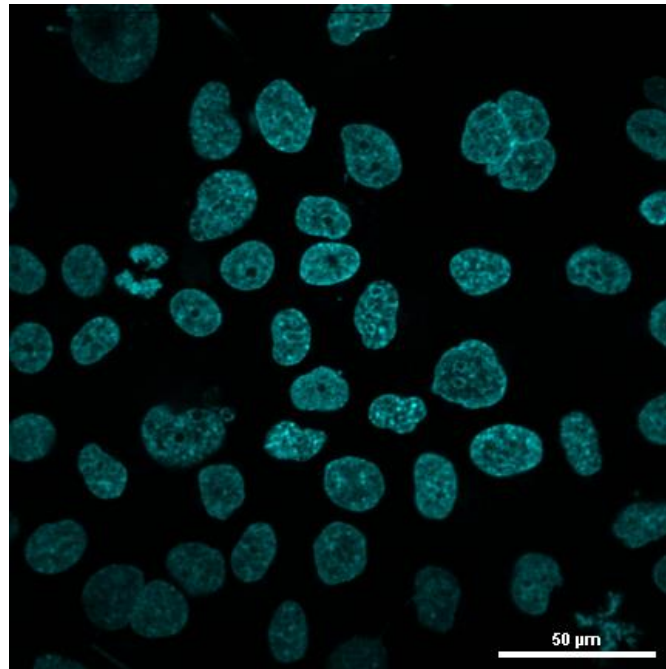


Abb. 8-27: HCE-T Zellen nach Inkubation mit Kultivierungsmedium und Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (blaue Fluoreszenz).

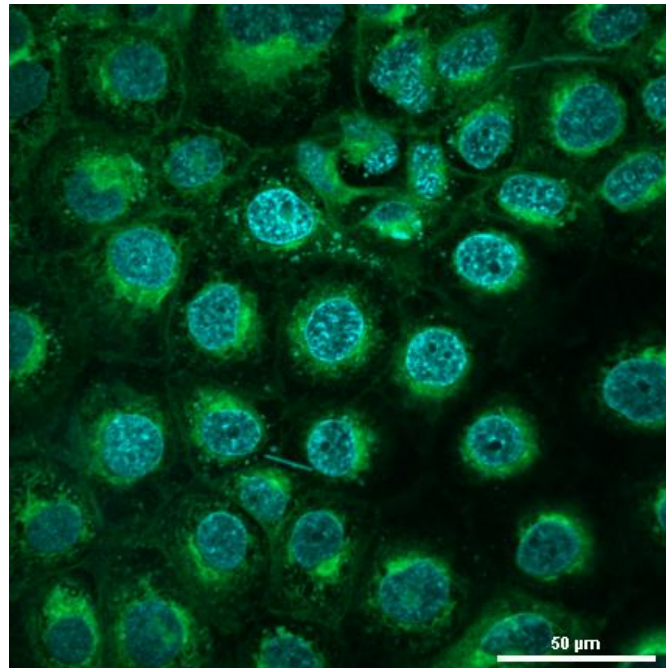


Abb. 8-28: HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit Coumarin 6-beladenen Liposomen und Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

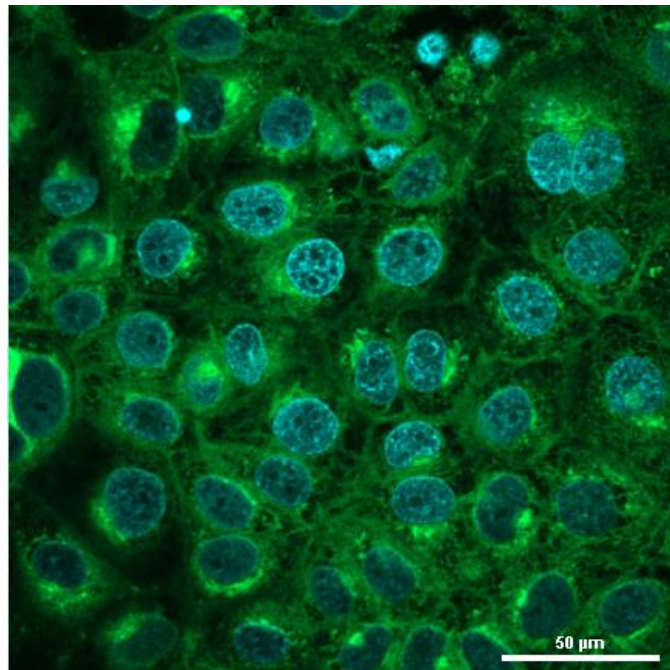


Abb. 8-29: HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit Coumarin 6-beladenen Mizellen aus Macrogol-15-hydroxystearat und Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

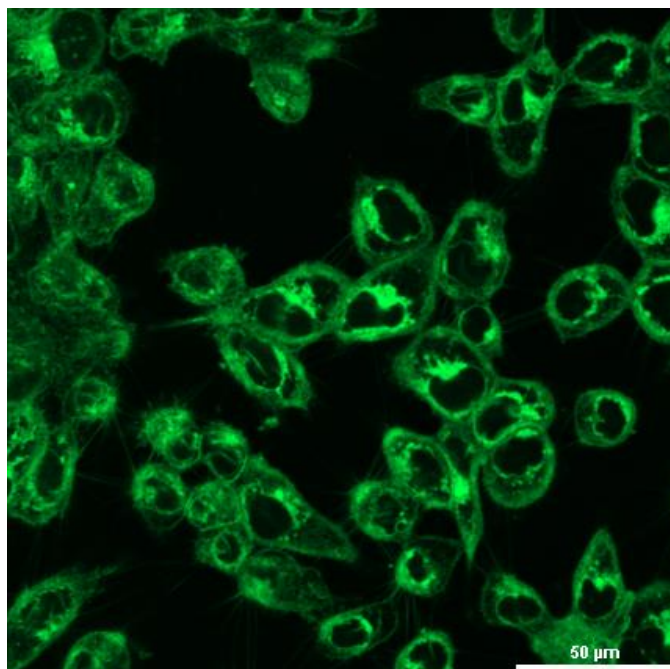


Abb. 8-30: HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit Coumarin 6 gelöst in DMSO. Auf eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 wurde verzichtet.

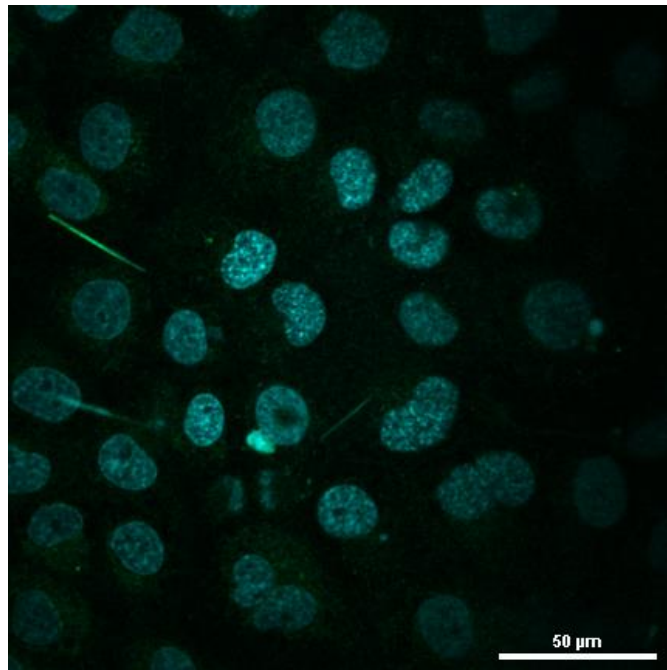


Abb. 8-31: HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit dem Filtrat aus Coumarin 6-beladenen SLN und Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

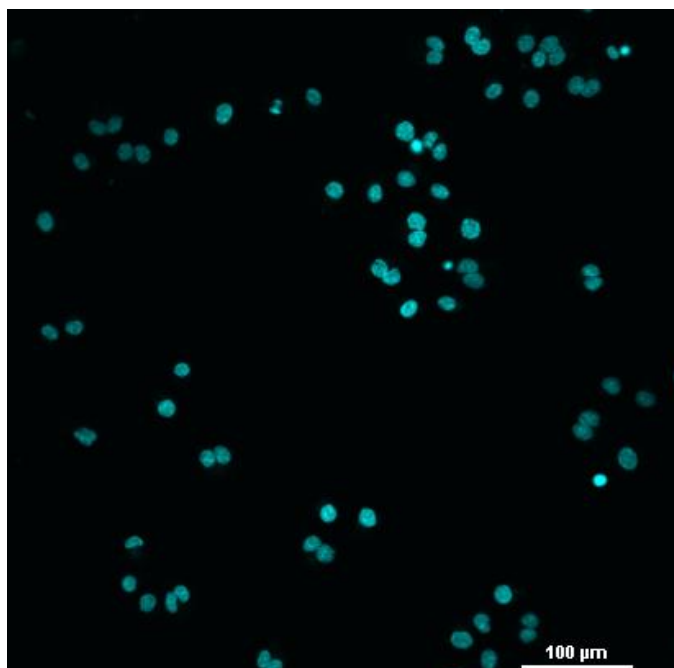


Abb. 8-32: HCE-T Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit SLN-DHPE und Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342

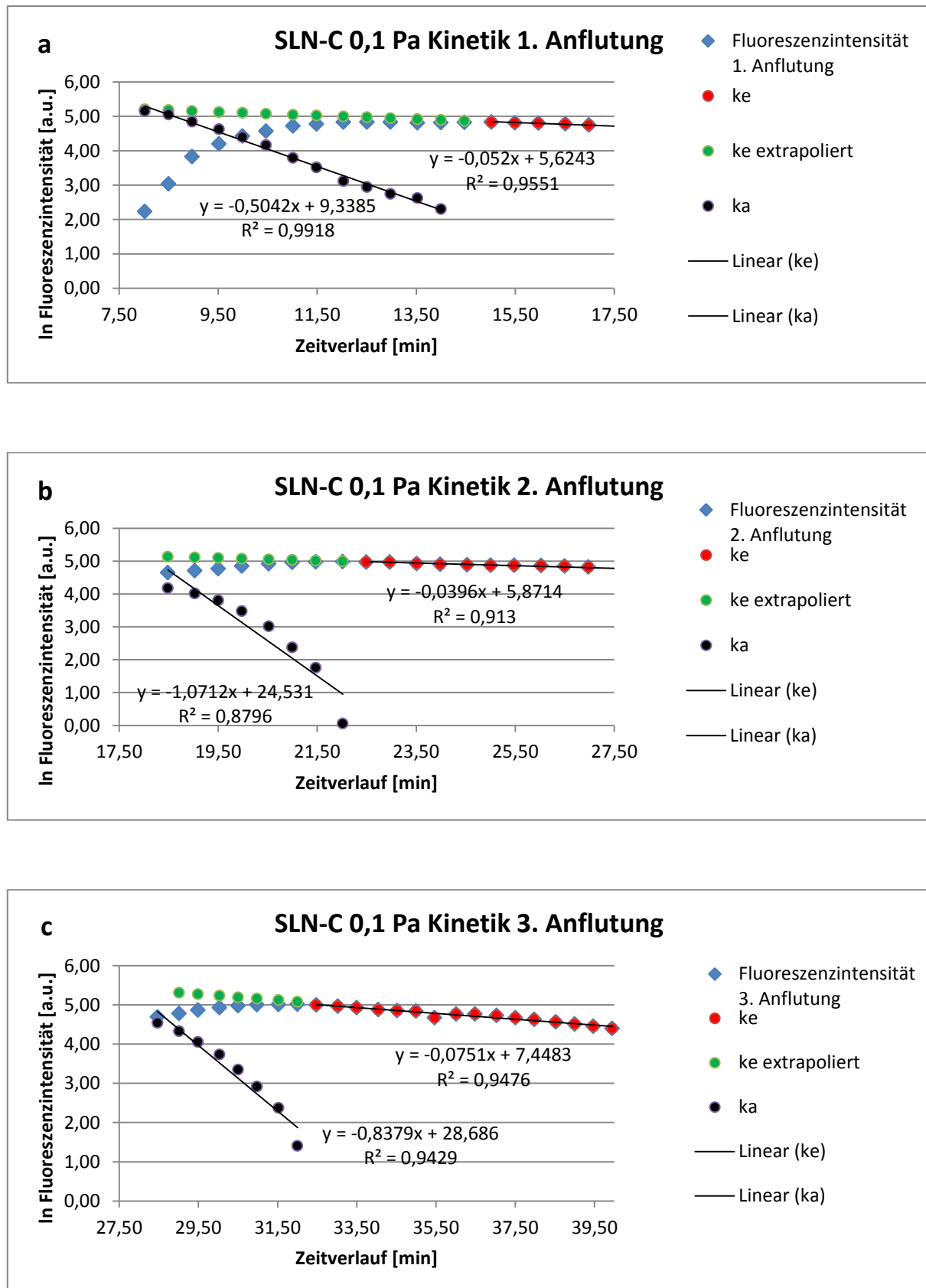


Abb. 8-33: Nach dem Abschälverfahren hergeleitete Absorptions- und Eliminationskinetiken für Coumarin 6, welches am 25.02.2014 mittels SLN auf HCE-T-Zellen binnen insgesamt 3 Anflutungen (Diagramme a-c) bei einem Scherstress von 0,1 Pa übertragen wurde

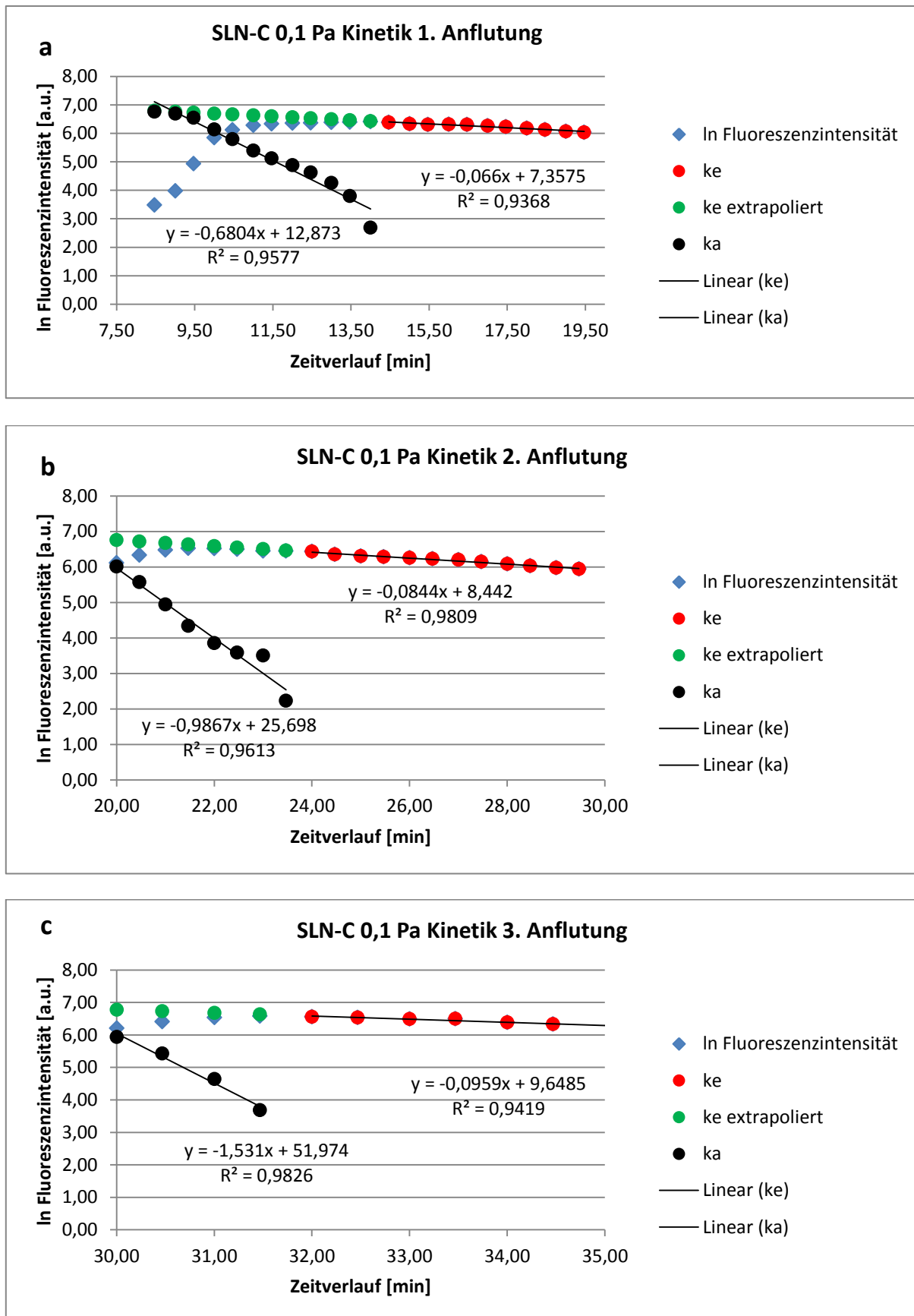


Abb. 8-34: Nach dem Abschälverfahren hergeleitete Absorptions- und Eliminationskinetiken für Coumarin 6, welches am 10.09.2013 mittels SLN auf HCE-T-Zellen binnen insgesamt 3 Anflutungen (Diagramme a-c) bei einem Scherstress von 0,1 Pa übertragen wurde

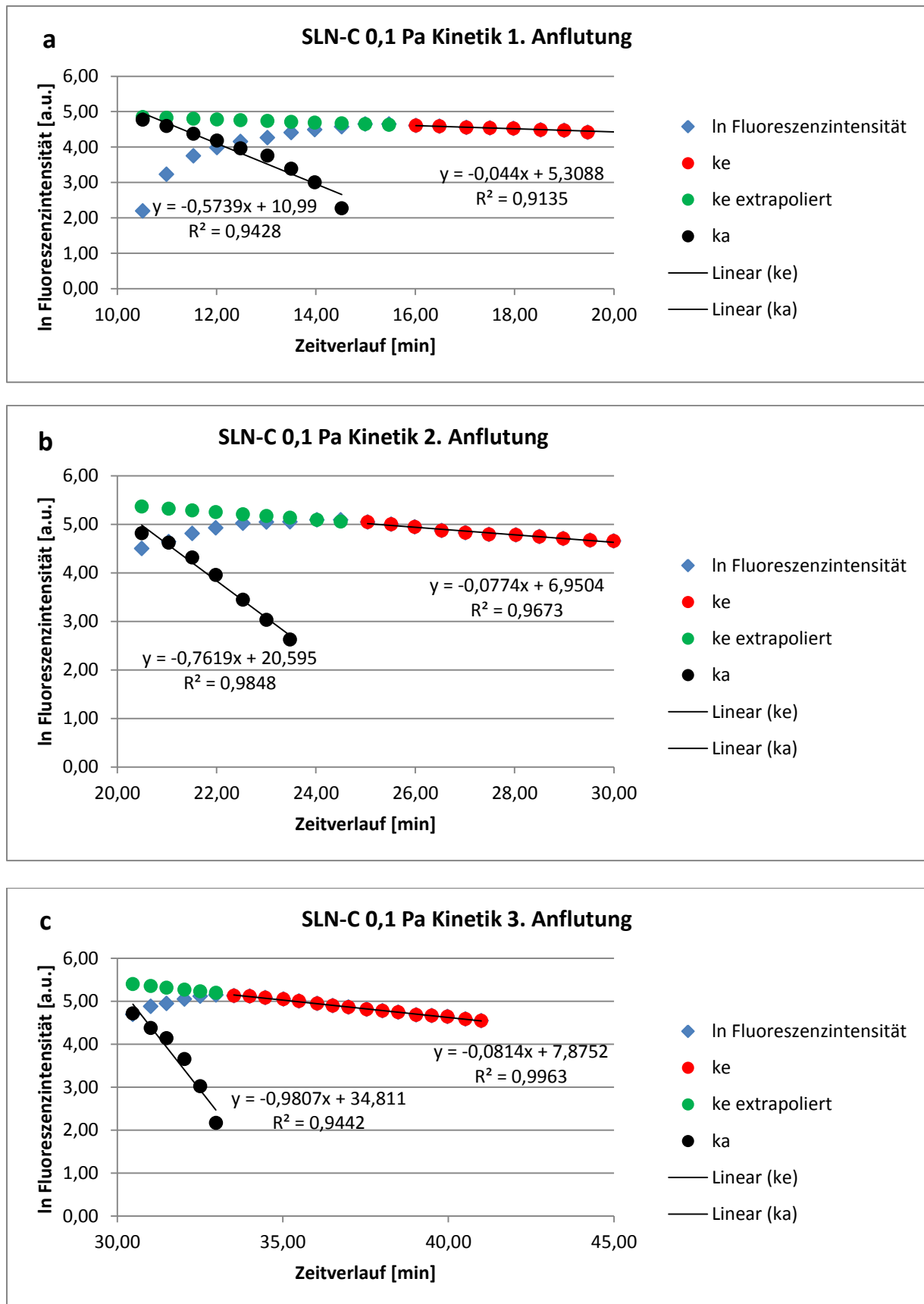


Abb. 8-35: Nach dem Abschälverfahren hergeleitete Absorptions- und Eliminationskinetiken für Coumarin 6, welches am 27.09.2013 mittels SLN auf HCE-T-Zellen binnen insgesamt 3 Anflutungen (Diagramme a-c) bei einem Scherstress von 0,1 Pa übertragen wurde

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sascha Pretor
Geburtsdatum:	17.04.1986
Geburtsort:	Holzminden
E-Mail-Adresse:	sascha.pretor@freenet.de
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulische Ausbildung

1992-1996	Grundschule im Forstbachtal, Negenborn
1996-1998	Orientierungsstufe Liebigstraße, Holzminden
1998-2005	Campe Gymnasium, Holzminden
24.06.2005	Allgemeine Hochschulreife

Studium

2006-2010	Studium der Pharmazie, TU Braunschweig
03.04.2008	Abschluss 1. Staatsexamen
22.04.2010	Abschluss 2. Staatsexamen
26.05.2011	Erlangung der Approbation als Apotheker

Promotionsstudium

01.05.2011 Beginn der Dissertation am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

Berufstätigkeit

02.10.2006-27.10.2006 Famulatur in der Kur-Apotheke, Bodenwerder, Inh. Hendrik Diepenbrock e.K.

WS 2006/2007 Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig

05.03.2007-30.03.2007 Famulatur in der Apotheke des Klinikums Hildesheim

20.08.2007-14.09.2007 Famulatur in der Apotheke des St. Bernward-Krankenhauses, Hildesheim

SoSe 2008-WS 2008/09 Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig

01.08.2008-30.09.2008 Famulatur bei Solvay Pharmaceuticals Hannover, Enzyme competence center

01.05.2010-31.10.2010 Pharmazeut im Praktikum in der Herz-Apotheke, Holzminden, Inh. Dr. Christian Mignat (Fachpharmakologe DGPT)

01.11.2010-30.04.2011 Pharmazeut im Praktikum bei der Hameln Group, Hameln

2011-2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig

2015-2016 Apotheker in der Münchhausen-Apotheke, Bodenwerder, Inh. Dr. Christian Mignat (Fachpharmakologe DGPT)

Seit 01.01.2017 Filialleitung der Münchhausen-Apotheke, Bodenwerder